

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

UNTERSUCHUNGEN ZUR ÜBERPRÜFUNG EINES REAGENS-KITS ZUR QUANTITATIVEN PHOTOMETRISCHEN BESTIMMUNG VON SALICYLAT IM SERUM

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Dr. Walter Mauser
aus Erlangen

1903

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

UNTERSUCHUNGEN ZUR ÜBERPRÜFUNG EINES REAGENS-KITS ZUR QUANTITATIVEN PHOTOMETRISCHEN BESTIMMUNG VON SALICYLAT IM SERUM

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Dr. Walter Mauser
aus Erlangen

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. F. Wolf
Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt
Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling
Tag der mündlichen Prüfung: 09.04.1984

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<u>I. EINLEITUNG</u>	1
1. SALICYLATE, EIN HISTORISCHER RÜCKBLICK	1
2. CHEMIE DER SALICYLATE	3
3. PHARMAKOLOGIE DER SALICYLATE	6
3.1 Anwendungsbereiche	6
3.2 Wirkungsmechanismus	9
3.3 Resorption	15
3.4 Biotransformation, Verteilung und Elimination	17
3.5 Nebenwirkungen	25
4. TOXIKOLOGIE UND THERAPIE DER SALICYLATVERGIFTUNG	31
<u>II. PROBLEMSTELLUNG</u>	37
<u>III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN</u>	38
1. GEWINNUNG UND AUFBEWAHRUNG VON SERUM UND URIN	38
2. MESSUNG DER EXTINKTION	38
3. BERECHNUNG UND RICHTIGKEITSKONTROLLE	43
4. PRÄZISIONSKONTROLLE	44
5. ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN	44
5.1 Salicylateichkurven in wässriger Lösung (Methode nach Pierce)	45

5. 2 Salicylateichkurven im Serum (Methode nach Pierce)	50
5. 3 Salicylateichkurve im Serum (Methode nach Trinder)	55
5. 4 Standardeichkurve (Methode nach Pierce)	59
5. 5 Salicylateichkurve im Urin (Methode nach Pierce)	61
5. 6 Salicylursäureeichkurve im Urin (Me- thode nach Pierce)	64
5. 7 Haltbarkeit des Ansatzes	67
5. 8 Untere Nachweisgrenze	68
5. 9 Nachweis sehr hoher Konzentrationen von Salicylat bzw. Salicylursäure im Serum und im Urin	68
5.10 Interferierende Substanzen	71

IV. DISKUSSION 73

V. ZUSAMMENFASSUNG 77

VI. LITERATURVERZEICHNIS 79

VII. ANHANG 89

I. EINLEITUNG

1. SALICYLATE, EIN HISTORISCHER RÜCKBLICK

Der Name Salicylsäure kommt von dem botanischen Namen für Weide: *Salix*. Die Bitterstoffe der Rinde verschiedener Weidenarten wurden schon von Hippokrates, Celsius und Galen als Heilmittel bei fieberhaften Erkrankungen angewandt. Stone (1763) dürfte der Erste gewesen sein, der in wissenschaftlicher Art in der englischen medizinischen Gesellschaft über die Weidenextrakte berichtete.

1828 gewann Buchner aus der Weidenrinde eine gelbliche, teilweise nadelförmig kristallisierte, sehr bitter schmeckende Substanz, die er wie o.a. Salicin nannte.

Piria (1838) zeichnete sich dadurch besonders aus, daß er Salicin aus den Blättern der Silberweide (*Salix alba*) gewann, es mit Chromsäure versetzte und schließlich mit Ätzkali oxidierte. Hierdurch entstand eine gut kristallisierende Säure, der er den Namen Salicylsäure gab.

Ähnliches gelang - wie sich aber erst im nachhinein herausstellte - dem Züricher Chemiker Löwig bereits 1835.

1843 erreichte Gerhardt die Analyse der Salicylsäure, wobei er den Zerfall in Phenol und Kohlensäure nachwies. Jedoch erst sechzehn Jahre später, also 1859, konnte Kolbe die Synthese der Salicylsäure aus Natrium, Phenol und Kohlensäure durchführen.

Der Chemiker *Dr. v. Heyden* richtete erstmals 1874 einen industriellen Betrieb zur Herstellung von Salicylsäure unter dem Namen "Salicylfabrik Dr. v. Heyden" ein.

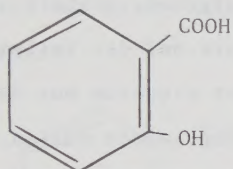
Der Durchbruch zur umfangreichen therapeutischen Nutzung der Salicylsäure erfolgte schließlich durch die Verbindung mit Essigsäure zur Acetylsalicylsäure. Dies ist ein Verdienst von *F. Hoffmann* (1897). Die von ihm synthetisierte Verbindung Acetylsalicylsäure wurde dann von der Firma Bayer unter dem bekannten Namen Aspirin[®] produziert und vertrieben.

Heutzutage sind die Salicylsäure bzw. ihre Derivate aus der analgetischen, antipyretischen, antiphlogistischen, antirheumatischen und antithrombotischen Therapie kaum mehr wegzudenken. So betrug allein die geschätzte Produktion der Acetylsalicylsäure, die sicherlich mit weitem Vorsprung den Hauptvertreter der Salicylatgruppe darstellt, im Jahre 1978 100 000 Tonnen (*Bieberfeld, Shaw und Taintor, 1978*).

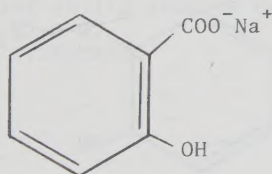
Der Tablettenverbrauch - nur die USA betreffend - lag hierbei bei etwa 15 bis 16 Milliarden. Diese enormen Zahlen zeigen eindrucksvoll einerseits die wirtschaftliche Bedeutung der Salicylsäure und ihrer Derivate, lassen andererseits aber auch den beabsichtigten oder unbeabsichtigten Mißbrauch dieser Medikamentengruppe erahnen.

2. CHEMIE DER SALICYLATE

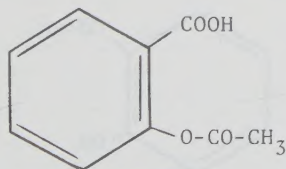
Die Salicylsäure stellt den Ausgangspunkt für die übrigen Salicylate dar. Sie wird auch als Acidum salicylicum, Spiro-säure oder Spiroylsäure bezeichnet und stellt sich chemisch als o-Hydroxybenzoesäure dar.



Meist kommt jedoch nicht die reine Salicylsäure zur Anwendung, sondern ihr Natriumsalz, da dessen Reizwirkung auf den Magen geringer ist.

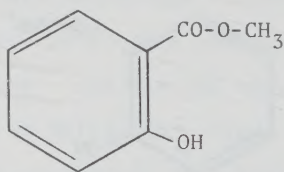


Das Salicylsäurederivat mit der weitesten Verbreitung und dem größten Anwendungsbereich ist zweifelsohne die Acetylsalicylsäure.

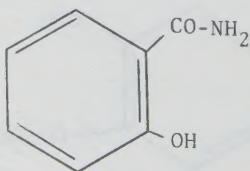


Dieser Essigsäureester der Salicylsäure trägt auch den Namen Acidum acetylosalicylicum und wird im Schrifttum weltweit häufig auch einfach Aspirin[®] genannt, was in Anlehnung an das erste, von der Bayer AG produzierte und vertriebene Präparat dieser Art geschieht. Der Acetylsalicylsäure gegenüber treten die Salicylsäure und deren übrige Derivate weitgehend in den Hintergrund. Deshalb seien die weiteren Derivate der Salicylsäure nur der Vollständigkeit halber genannt, wobei auch hier wiederum nur die wichtigsten Abkömmlinge zur Darstellung kommen sollen.

Das Methylsalicylat oder auch Methylsalicylsäureester bzw. Methylum salicylicum ist praktisch identisch mit dem sog. Wintergrünöl (Gaultheriaöl, Oleum Gaultheriae) und stellt sich chemisch folgendermaßen dar:

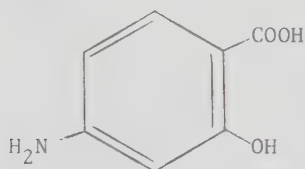


Ein weiteres wesentliches Derivat der Salicylsäure, das Salicylamid, ist chemisch als o-Hydroxybenzoesäureamid definiert:



Es ist weder ein wirkliches Salicylat, weil es keine freie Carboxylgruppe hat, noch wird es - zumindest beim Menschen - zu Salicylat hydrolysiert. Demgemäß beruhen seine pharmakologischen Wirkungen auf dem Salicylamidmolekül und können nicht einer Umwandlung in Salicylat zugeschrieben werden (Smith, 1960).

Als letzter Vertreter der Salicylatreihe sei noch die p-Aminosalicylsäure aufgeführt.



Ihre Anwendung liegt jedoch im Vergleich zu den anderen Salicylsäurederivaten auf völlig anderem Gebiet und wird im nächsten Kapitel näher erläutert.

3. PHARMAKOLOGIE DER SALICYLATE

3.1 ANWENDUNGSBEREICHE

Die Salicylsäure findet in alkoholischer oder öligter Lösung, in Pudern und in Salben vorwiegend äußerlich als Keratolytikum ihre Anwendung. Daneben wird sie jedoch auch als Antimykotikum und Antihydrotikum benutzt. In größeren Dosen wirkt sie bei innerer Applikation stark magenreizend. Deshalb wird bei innerer Verwendung - wenn überhaupt - das Natriumsalz der Salicylsäure bevorzugt. Dieses dient hauptsächlich der Behandlung des akuten Gelenkrheumatismus. Selten kommt es auch als Desinfektionsmittel für die Harnwege und den Intestinaltrakt in Betracht. Seine antipyretische und analgetische Wirkung ist jedoch gering.

Wie oben schon erwähnt, ist das wichtigste und am häufigsten eingenommene Derivat der Salicylsäure die Acetylsalicylsäure. Dementsprechend ist ihr Anwendungsbereich aufgrund ihrer guten Wirksamkeit und wegen ihres weit gefächerten therapeutischen Spektrums am umfangreichsten.

Acetylsalicylsäure ist zum einen als Analgetikum im Gebrauch. Hierbei gehört es der Gruppe der schwachen Analgetika an und wirkt vorwiegend peripher über die Hemmung der Prostaglandinsynthese (s.u.). Jedoch werden auch zentrale Angriffspunkte zur Schmerzdämpfung auf subkorticaler Ebene, evtl. in Verbindung mit dem Thalamus, diskutiert (Goodman, Gilman, 1980).

Zum anderen läßt sich die Acetylsalicylsäure ebenso als Antipyretikum einsetzen. Dabei kommt es zu Schwellenwertveränderung in hypothalamischen Kerngebieten mit dem Ziel eines vermehrten peripheren Hitzeverlustes. Dies ist wahrscheinlich auf einen verminderten Anfall der Prostaglandine E_1 und E_2 zurückzuführen, die als wahrscheinliche Vermittler der Temperaturregulation gelten (s.u.).

Eine weitere Wirkung der Acetylsalicylsäure besteht in ihrer Bedeutung als Antiphlogistikum. Ebenso wie bei den beiden vorgenannten Effekten spielen hier wieder die Prostaglandine und deren Hemmung durch Acetylsalicylsäure eine Rolle, da diese an der Frühphase der Entzündungsreaktion durch Steigerung der Kapillarpermeabilität und Freisetzung von Lysosomenenzymen beteiligt sind. Dies scheint heute der Hauptmechanismus der antiphlogistischen Wirkung zu sein. Darüberhinaus sind jedoch auch die Hemmung der Hyaluronidase (*Mathews, Dortmann, 1955*), ferner die Unterdrückung der Biosynthese und des Metabolismus von Mucopolysacchariden (*Bollet, 1961*) sowie Milieuänderungen durch Bindung an Plasma- und Gewebsproteine (*Skidmore, Whitehouse, 1967, und Mizushima, Kobaysaki, 1968*) durch Acetylsalicylsäure im Gespräch.

Zusätzlich hat die Acetylsalicylsäure noch als Antirheumatikum Eingang in die Therapie gefunden, wobei die antirheumatische Wirkung in der Hauptsache der antiphlogistischen entspricht. Hinzu kommen aber Angriffspunkte im immunologischen Geschehen, wie die Suppression der Bildung von Antikörpern

bzw. von Antigen-Antikörperkomplexen und die der antigen-induzierten Histaminfreisetzung (*Austen*, 1963).

Schließlich bleibt noch die Verwendung der Acetylsalicylsäure als Antithrombotikum. Hierbei wird die Thrombozytenaggregation vermutlich durch Acetylierung von Epsilonaminogruppen von Lysinresten gehemmt (*O'Brien*, 1968). Daneben spielt die Hemmung der TxA_2 -Synthese, eines vasokonstriktorisch wirkenden Prostaglandins, das wahrscheinlich als Hauptvermittler der von exogener und endogener Arachidonsäure induzierten Plättchenaggregation fungiert (*Lewis*, 1981), eine entscheidende Rolle.

Das Methylsalicylat oder auch Wintergrünöl wird heute noch zur äußeren Anwendung in rheumatischen Salben oder Linimenten angeboten. Ein höherer Estergehalt als 5% ist in derartigen Mitteln besonders für Kinder toxisch; mehrfach sind Todesfälle nach perkutaner Applikation von Methylsalicylat beschrieben worden.

Salicylamid hat ähnliche Therapiebereiche wie Acetylsalicylsäure, vorwiegend Nutzung findet es jedoch in der Rheumabehandlung. Die Salicylamidtherapie ist wegen der fast ebenso schnellen Elimination wie Absorption dieser Substanz heftig umstritten. *Prescott* (1968) geht nach vielen klinischen Erfahrungen sogar so weit, zu behaupten, daß Salicylamid von einem Placebo nicht zu unterscheiden sei.

Schließlich bleibt von den wichtigeren Salicylsäurederivaten noch die p-Aminosalicylsäure zu erwähnen. Wie oben schon angeführt, findet ihr Einsatz nicht auf analgetischem, antipy-

retischem, antiphlogistischem, antirheumatischem oder antithrombotischem Gebiet statt, vielmehr hat sie wachstumshemmende Eigenschaften für Tuberkelbakterien. Der hierfür verantwortliche Mechanismus dürfte auf der kompetitiven Hemmung des Bakterienwuchsstoffes p-Aminobenzoessäure beruhen. Die p-Aminosalicylsäure stellt zur Zeit jedoch ein Reservemittel für die Tuberkulosebehandlung dar, da bessere Tuberkulostatika im Handel sind.

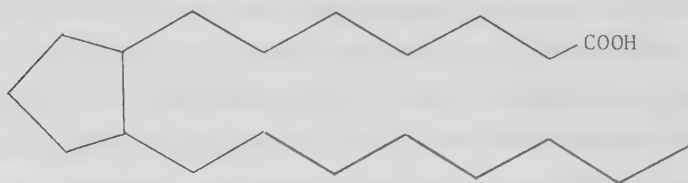
Zusammenfassend läßt sich über die Salicylsäurederivate mit den Worten von *Smith* (1960) sagen: "Eine große Zahl von salicylatverwandten Verbindungen sind in die Therapie eingeführt worden, aber bisher konnte bei keiner weder eine vergleichsweise klinische Wirkung noch das Fehlen von unerwünschten Störeffekten festgestellt werden. Der dominierende Effekt bleibt der Acetylsalicylsäure vorbehalten." Aus diesem Grund beziehen sich die nachfolgenden Darstellungen der Wirkungsweise, Pharmakokinetik und Toxikologie der Salicylate vorwiegend auf die Acetylsalicylsäure, wobei die dort getroffenen Aussagen mit gewissen Einschränkungen aber auch für die übrigen Salicylsäurederivate Gültigkeit besitzen.

3.2 WIRKUNGSMECHANISMUS

Vane wies 1971 nach, daß nichtsteroidale Antirheumatika wie die Acetylsalicylsäure hemmend auf die Prostaglandinsynthese

einwirken. Diese Entdeckung brachte den Durchbruch bei den bis dahin sehr unzureichenden Erklärungsversuchen des Wirkmechanismus von Aspirin®. In der Folgezeit wurde immer deutlicher, daß dieser Inhibitionsvorgang als nahezu ausschließlich für alle therapeutischen Effekte (s.o.), aber auch für die meisten unerwünschten Begleiterscheinungen (s.u.) der Acetylsalicylsäure Geltung besitzt.

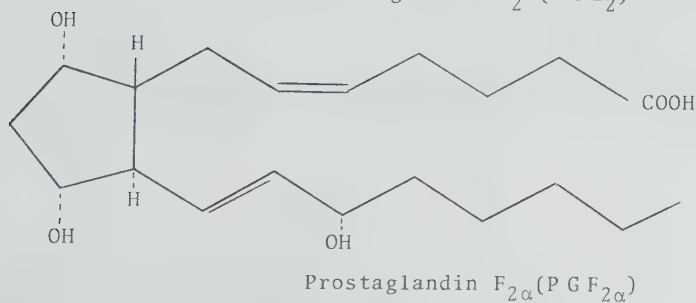
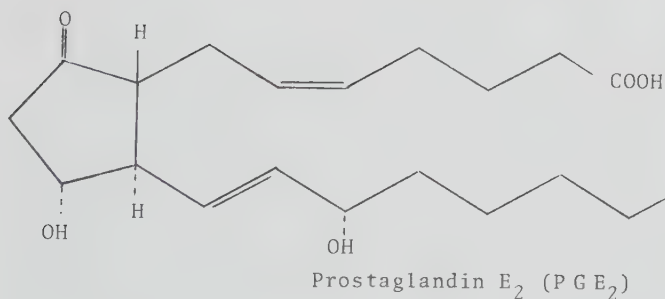
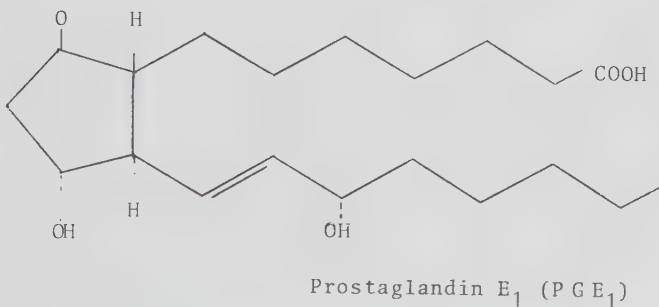
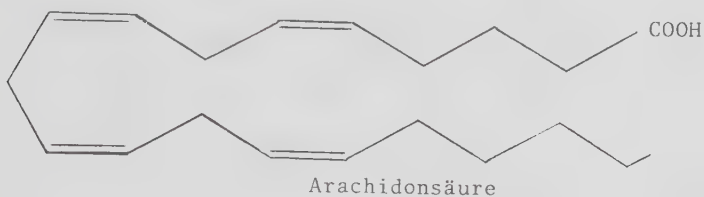
Bei den Prostaglandinen handelt es sich chemisch um ungesättigte hydroxylierte C₂₀-Fettsäuren, deren Grundgerüst die Prostansäure ist:

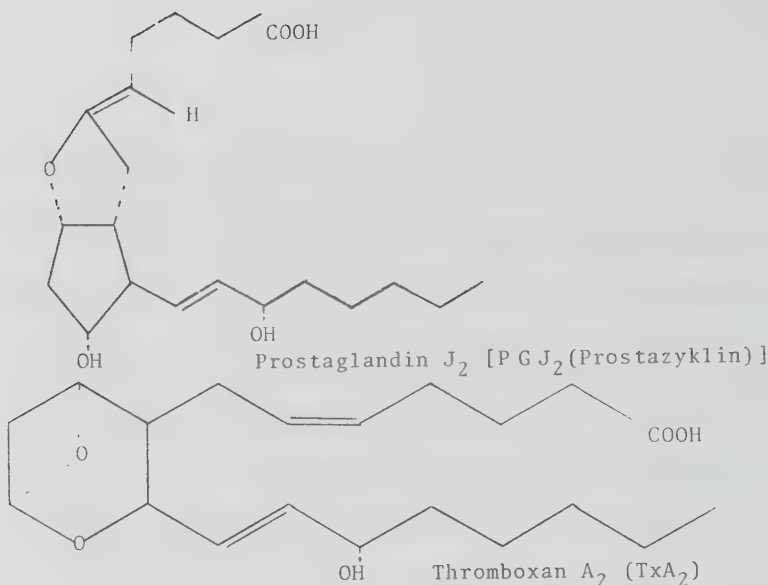


Sie besitzen wie die Prostansäure alle einen Zyklopentanring, darüberhinaus jedoch zusätzlich in 13-Stellung eine trans-Doppelbindung und in Position 15 eine OH-Gruppe. Je nach Unterschieden am Zyklopentanring werden die Prostaglandine in unterschiedliche Gruppen eingeteilt: A, B, E und F. Synthetisiert werden die Prostaglandine aus C₂₀-Trien-, Tetraen- oder Pentaen-Fettsäuren, z.B. aus Arachidonsäure, Dihomo- γ -Linolensäure oder Eikosapentaensäure, unter Katalyse des Multienzymkomplexes Prostaglandin-Synthetase und mit Beteiligung von Sauerstoff.

Heute kennt man ca. 15 verschiedene Prostaglandine (Wagner, 1980), die in allen Organen, Geweben und Körperflüssigkeiten

von Mensch und Tier, auch in Intervertebraten, beispielsweise in Korallen, vorkommen und von denen die wichtigsten im Vergleich zur Ausgangssubstanz Arachidonsäure nachfolgend dargestellt sind:





Arachidonsäure gehört dem Typ der ungesättigten Fettsäuren an, die u.a. Bestandteile der Zellmembran sind.

Die Prostaglandine der E-Reihe sind wie oben erwähnt an der Fieberentstehung beteiligt. Außerdem wirken sie vasodilatatorisch und erhöhen die Gefäßpermeabilität. Über das c-AMP-System der Lymphozyten aktivieren sie die Suppressor-T-Zellen (Bourne et al., 1974) und spielen so bei der Immunantwort eine entscheidende Rolle. Ferner setzen sie schmerzinduzierende Mediatoren wie Bradykinin, Histamin und Serotonin (Ferreira, 1972) frei. Außerdem kontrahieren sie die Darmmuskulatur und den schwangeren Uterus, was ihnen mit den Prostaglandinen der F-Reihe gemeinsam ist. Ferner steigern sie die Hormonproduktion in den meisten endokrinen Drüsen. Thromboxan A_2 ist vasokonstriktorisch aktiv und fördert die Aggregationstendenz von Thrombozyten. Prostazyclin (PGI₂)

ist in beiden Belangen sein direkter Antagonist (*Lewis*, 1981).

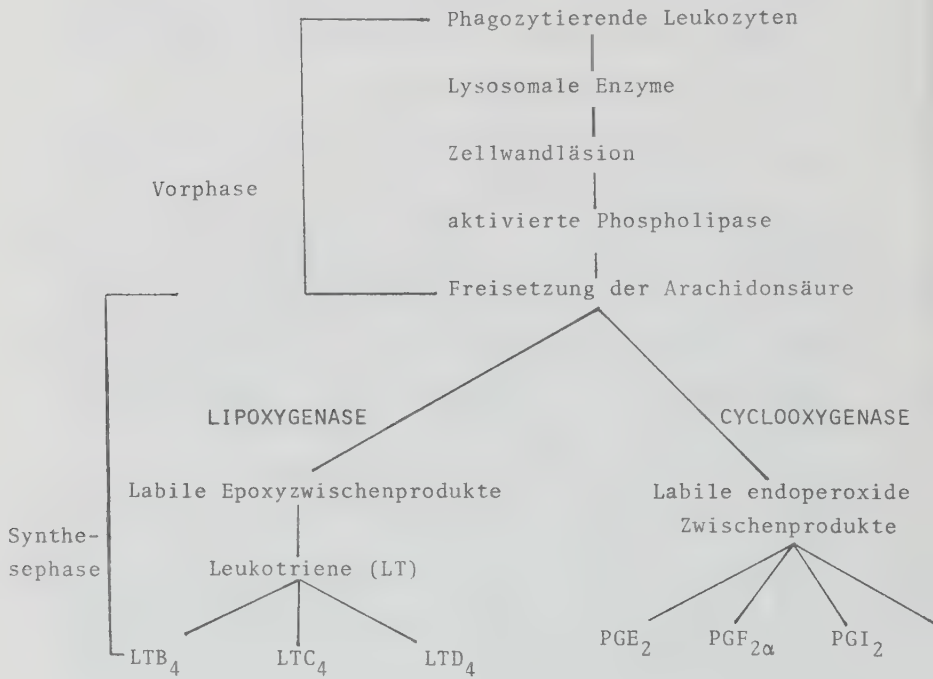
Die angeführten Prostaglandine sind nur ein Teil - wenn auch wahrscheinlich die wichtigsten - der gesamten Gruppe. Ebenso erheben die Wirkungsweisen keinen Anspruch auf Vollständigkeit, da eine umfassende Darstellung den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde. Vielmehr dient ihre Auflistung dem besseren Verständnis des Folgenden.

Der Reaktionsprozeß hin zu den Prostaglandinen läuft nun im Prinzip und stark vereinfacht wie in Abb. 1 dargestellt ab. Die Wirkung der Acetylsalicylsäure beruht demzufolge auf der irreversiblen Hemmung des Enzyms Cyclooxygenase durch Acetylierung. Die Abb. 1 veranschaulicht deutlich, daß hierdurch die Gesamtheit der Prostaglandine (es sind nicht alle aufgeführt) inhibiert wird, wodurch sich o.a. Wirkungen der Acetylsalicylsäure erklären.

Die in Abb. 1 zusätzlich vorgestellten Leukotriene sind erst jüngst gefunden worden (*Lewis*, 1981). Sie sind sowohl vasokonstriktorisch als auch bronchokonstriktorisch aktiv und erhöhen die Gefäßpermeabilität. Sie fördern jedoch nicht die Thrombozytenaggregation. Aus Abb. 1 ist nun zu entnehmen, daß bei der Cyclooxygenaseinaktivierung unter Umständen vermehrt Leukotriene anfallen können. Hierzu ist anzumerken, daß Cyclooxygenaseinhibitoren in höheren Konzentrationen auch die Leukotrienbildung - evtl. über die Lipoxxygenase - hemmen können, woraus sich möglicherweise neue therapeutische Hin-

weise ergeben. Dies wird das Ziel näherer wissenschaftlicher Abklärung sein.

Abb. 1: Prostaglandinsynthese als Ausgangspunkt der Wirkungsweise von Acetylsalicylsäure (mod. nach *Lewis*, 1981)



3.3 RESORPTION

Die Salicylate werden im Magen und oberen Dünndarm sehr gut resorbiert. Hierbei besteht kein nennenswerter Unterschied zwischen Acetylsalicylsäure, Natriumsalicylat oder gepufferten Aspirinzubereitungen (*Cohen*, 1976). Die Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt ist im wesentlichen von drei Punkten abhängig: den Löslichkeitseigenschaften der Darreichungsform des Präparats, der für die Magenpassage zur Verfügung stehenden Zeit und ganz entscheidend vom pH-Wert des jeweiligen Milieus (*Levy* und *Leonards*, 1966). Das pH-Optimum liegt dabei zwischen 2,5 und 4, da in diesem Bereich die Acetylsalicylsäure - eine schwache organische Säure - in ihrer undissoziierten lipidlöslichen Form vorliegt und somit die Membranen des Magendarmtrakts mittels passiver Diffusion am leichtesten zu durchdringen vermag. In den Mukosazellen des Magens, deren intrazellulärer pH-Wert 7,0 beträgt, ist dann aufgrund der großen pH-Differenz die Konzentration des Acetylsalicylsäureanions um ca. 15-20 mal höher als im Magenvolumen. Dieser deutliche Konzentrationsunterschied ist im Dünndarm durch seine geringeren pH-Differenzen nicht derart ausgeprägt.

Nach *Clarke* (1962) gibt es auch genetisch bedingte Abweichungen im Resorptionsverhalten. Er fand bei seinen Untersuchungen zwei Gruppen, von denen die eine Salicylate schnell aufnimmt, wohingegen die andere nur langsam ihre Blutwirk-

spiegel erreicht. Dieses Verhalten wird von einem Genpaar kontrolliert und für die schnellere Resorptionsform dominant vererbt. Es ist jedoch umstritten, ob dieses Genpaar wirklich die Resorption kontrolliert, oder nicht vielmehr der rasche Abbau dominant vererbt ist (Saxl, 1971). Eine Klärung muß weiteren wissenschaftlichen Studien überlassen bleiben.

Zur Veranschaulichung des Zusammenhangs Aspirinaufnahme und Serumkonzentration sei gesagt, daß bei einer therapeutischen Dosis von 600 mg Acetylsalicylsäure oral appliziert mit einem Wirkspiegel von ungefähr 5 mg/dl zu rechnen ist. Es ist hingegen zu beachten, daß hohe Dosen, die in der Nähe von Vergiftungen anzusiedeln sind, wegen der Hemmwirkung von Acetylsalicylsäure auf die Magenentleerung wesentlich langsamer resorbiert werden als niedrige Dosen, woraus bei Intoxikationsverdacht Beobachtungszeiträume von mindestens 24 Stunden resultieren.

Neben der oralen Anwendung kann Acetylsalicylsäure auch rektal gegeben werden. Aus derartigen Suppositorien sollen bis zu 75% des jeweiligen Wirkstoffes resorbiert werden. Da die Aufnahme jedoch nur langsam und unvollständig erfolgt, und Irritationen sowie Erosionen der Mukosa die Folge sein können, sollten Salicylate nur selten auf diese Art und Weise appliziert werden (Levy, 1978).

Eine weitere Darreichungsform der Salicylsäure besteht in der Zumischung zu Salben zur Keratolyse. Soyka (1980) konnte

anhand zweier Brüder, die periodisch über mehrere Jahre hinweg eine 6%-ige Salicylsäurezubereitung als Keratolytikum anwandten, nachweisen, daß mehr als 60% dieser Salicylsäure perkutan aufgenommen werden können. So ist es möglich, daß selbst bei kutaner Verwendung von salicylsäurehaltigen Salben und entsprechend großflächiger Applikation Intoxikationen, ja sogar Todesfälle vorkommen können. Selbstverständlich besteht auch die Möglichkeit Acetylsalicylsäure in Form ihres Lysinsalzes parenteral zu geben. Der höchste Wirkspiegel wird hierbei schon zwei Minuten nach Injektion von 500 mg Acetylsalicylsäure erreicht (Beyer, 1977).

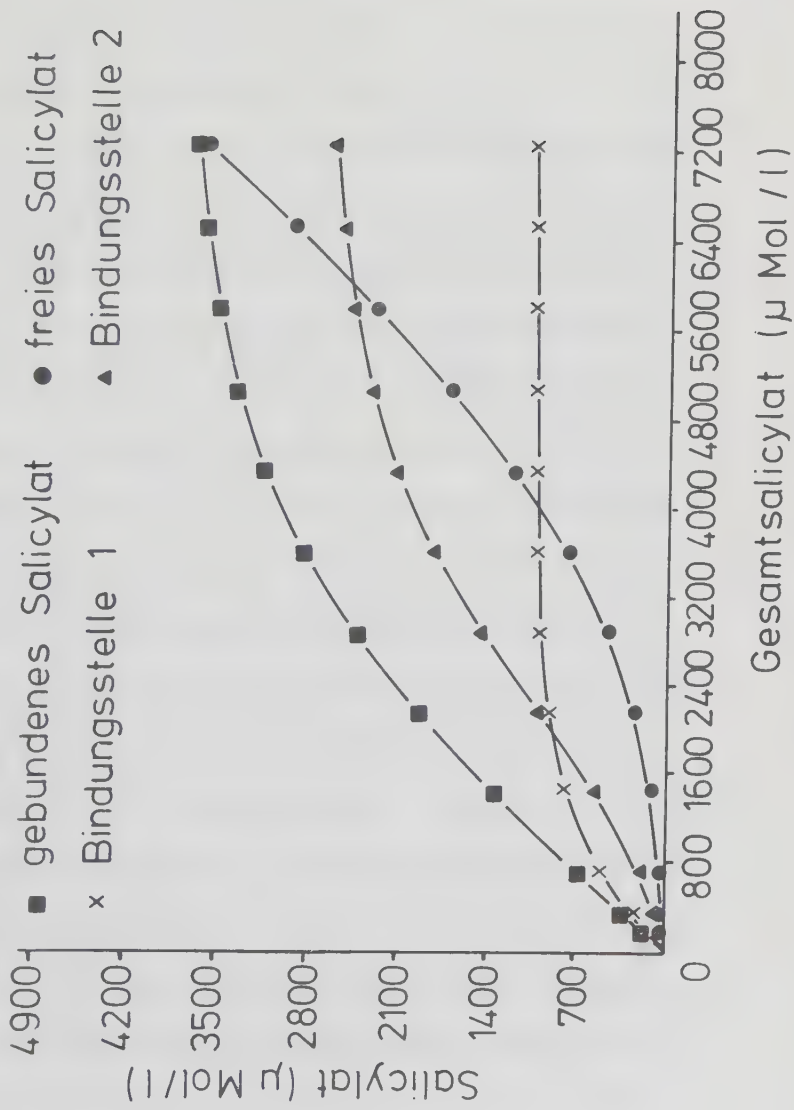
3.4 BIOTRANSFORMATION, VERTEILUNG UND ELIMINATION

Acetylsalicylsäure wird während und nach ihrer Resorption durch Esterasen zu Salicylsäure hydrolysiert. Dies geschieht sowohl im Plasma als auch in nahezu allen Geweben, wobei die höchsten Umsatzgeschwindigkeiten mit $k = 0,430$ und $k = 0,246$ von Leber und Niere erreicht werden (Möhlenbruch, 1974). Demgegenüber ist die Hydrolyserate von Vollblut mit $k = 0,018$ und Plasma mit $k = 0,007$ fast die langsamste bezüglich der Organe und Gewebe des Menschen. Entsprechend der Hydrolysegeschwindigkeiten variieren auch die Halbwertszeiten, die im Schrifttum über Acetylsalicylsäure im allgemeinen mit 15 bis 20 Minuten im Gefäßsystem angegeben werden. Der größte Teil der rasch entstehenden Salicylsäure wird nun

an Plasmaproteine, vor allem Albumin, gebunden. Hierbei konkurriert Salicylsäure mit vielen endogen gebildeten Substraten wie Bilirubin, Uraten und Schilddrüsenhormon um die bindungsfähigen Stellen am Protein. Prinzipiell können Salicylate am Serumalbumin an zwei verschiedenen Seiten gebunden werden (*Davison und Smith*, 1961). In welchem Umfang und an welcher der beiden Bindungsvalenzen die Salicylate adaptiert sind und damit auch das Verhältnis von freiem zu fixiertem Salicylat, bestimmt letztendlich die applizierte Dosis und mithin ihre Konzentration im menschlichen Körper (Abb. 2).

Obwohl es sich bei Abb. 2 um ein auf in vitro Daten durch Computerprogramm erhaltenes Schema handelt, darf man entsprechende Verhältnisse auch in vivo erwarten. Es zeigt sich, daß bei einer Konzentration von $7200 \mu\text{Mol/l}$ (ca. 100 mg/dl) freies und gebundenes Salicylat bei 5 g/dl Albumin (oberer Normbereich) in etwa gleich sind. Bei höheren Konzentrationen würde das freie und bei niedrigeren das gebundene Salicylat überwiegen. In den unteren Dosisbereichen wird vorwiegend die Bindungsstelle 1 mit hoher Affinität besetzt, die aber bei ungefähr 20 mg/dl abgesättigt ist und ab 30 mg/dl sogar durch die Bindungsstelle 2 mit geringer Affinität, jedoch hoher Kapazität im Bindungsumfang übertroffen wird. Deutlich veranschaulicht Abb. 2 die Abhängigkeit von freiem und gebundenem Salicylat von der Salicylatgesamtkonzentration im Plasma.

Abb. 2: Darstellung von freiem und gebundenem Salicylat und der jeweiligen Bindungsstelle in Abhängigkeit vom Gesamtsalicylatspiegel bei einer Albuminkonzentration von 725 $\mu\text{Mol/l}$ ($\approx 5\text{g/dl}$) und 37°C -Computeranalyse-. Jeweils 12 Salicylatkonzentrationen von 2,5 bis 100 mg/dl mit 2,5, 5 und 10 bis 100 in Zehnerschritten sind aufgetragen (mod. nach *Wositzki*, 1976)



Ferner dürfte der Zusammenhang Albuminkonzentration und Bindungskapazität einsichtig werden, welcher für Therapie und Intoxikation z.B. bei Hypoproteinämie entscheidend werden kann, da die freie Salicylsäure die gebundene bei 4g/dl Albumin schon 20 mg/dl früher überschreitet und aller Wahrscheinlichkeit nach nur der freie Medikamentenanteil therapeutische und toxische Effekte auszulösen vermag. Die angeführten Verhältnisse lassen es wünschenswert erscheinen, nicht nur - wie heutzutage üblich - die Salicylatgesamtkonzentration im Plasma oder Serum zu bestimmen, sondern vor allem den ungebundenen Wirkstoff genauer zu definieren.

Insgesamt auf den menschlichen Körper bezogen, sind die Salicylate ungleichmäßig verteilt. Zwei Kompartimente, ein zentrales und ein peripheres, werden unterschieden (*Rowland und Riegelman, 1968*). Das sog. zentrale Kompartiment beinhaltet hohe Salicylatspiegel und besteht aus Blut, Nierenrinde und Leber. Demgegenüber stellt sich das periphere Kompartiment aus verschiedenen anderen Organen zusammen, die geringe Wirkspiegel aufweisen. Der Abbau und damit die Elimination der Salicylate erfolgt mit Ausnahme des Salicylamids ausschließlich über die Salicylsäure. Die Biotransformation stellt dabei den einen Weg der Salicylatverminderung dar, die glomeruläre Filtration und tubuläre Sekretion von Salicylsäure den anderen. Letztlich werden alle Umwandlungsprodukte der Salicylsäure und sie selbst

nahezu gänzlich über die Niere ausgeschieden.

Neben der Salicylsäure gibt es noch vier andere Ausscheidungsprodukte mit unterschiedlicher Bedeutung und mit unterschiedlicher Enzymkapazität. Der wichtigste Transformationsweg der Salicylsäure im normalen Dosisbereich bis etwa 10 mg/kg (Levy, 1978) ist die Konjugation mit Glycin zur Salicylursäure. Jedoch ist dieser Weg bei antiphlogistischer und antirheumatischer Therapie bereits abgesättigt. Ebenso ergeht es dem zweitwichtigsten Abbauprodukt, dem Salicylsäurephenolglucuronid. Bei niedrigen Einzelgaben (s.o.) werden nahezu 80% der Salicylsäure über diese beiden Metabolismen eliminiert. Wichtig dabei ist, daß die maximale Umsatzgeschwindigkeit (U_{max}) für die Bildung von Salicylursäure schon bei Gabe von 0,8 oder 0,9 mg/kg/h und die U_{max} für die Bildung von Salicylsäurephenolglucuronid bei Gabe von ca. 0,4 mg/kg/h erreicht wird (Furst et al., 1977). Zwei weniger wichtige Ausscheidungsprodukte sind das Salicylsäureacylglucuronid und die Gentisinsäure. Obwohl ihre Entstehung einer linearen Eliminationskinetik gehorcht und somit weitgehend unabhängig von der Salicylsäurekonzentration ist, bilden sie am Gesamtausscheidungsvolumen der Salicylsäure und ihrer Metaboliten nur einen geringen Anteil von wenigen Prozent. Vielmehr ist die Elimination von freier Salicylsäure, die ebenfalls einer linearen Kinetik erster Ordnung folgt, bei hohen Konzentrationen von ausschlaggebender Bedeutung. Den Stoffwechsel der Salicylate einschließlich des hier kurz erwähnten Salicylamids zeigen Abb. 3 und Abb. 4.

Abb. 3a: Stoffwechsel der Salicylsäure und ihrer Derivate Acetyl- und Methylsalicylsäure (mod. nach Geldmacher-v.Mallinckrodt, 1976)

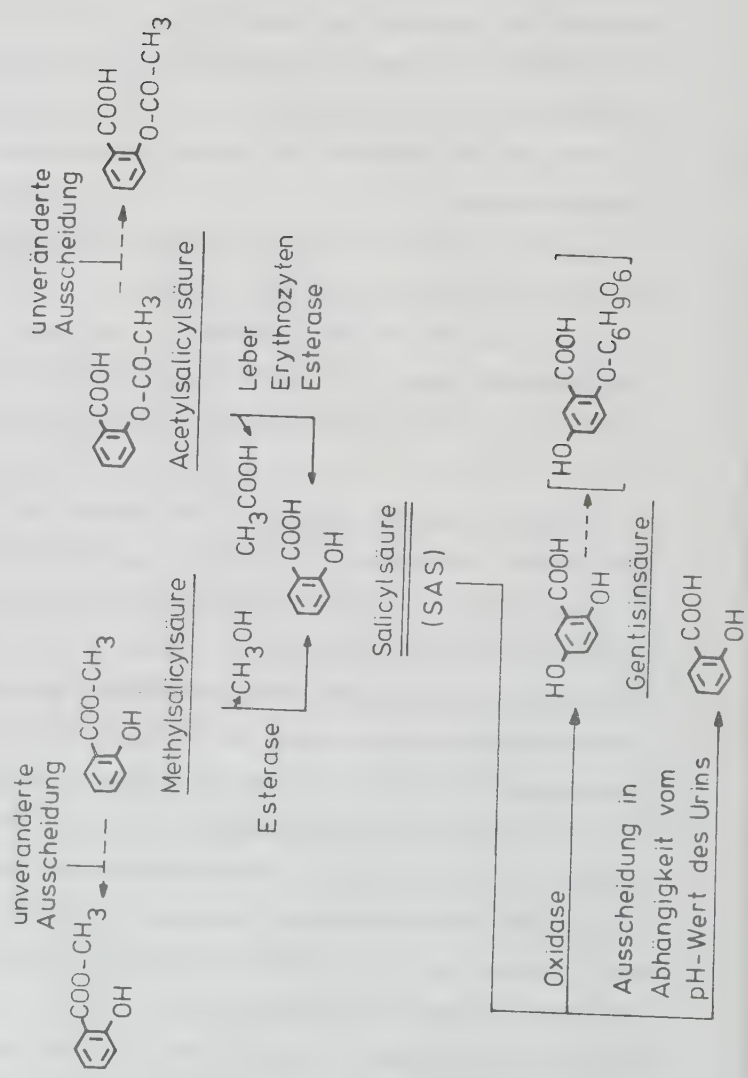


Abb. 3b: Stoffwechsel der Salicylsäure und ihrer Derivate Acetyl- und Methylsalicylsäure (mod. nach *Geldmacher-v.Mallinckrodt*, 1976)

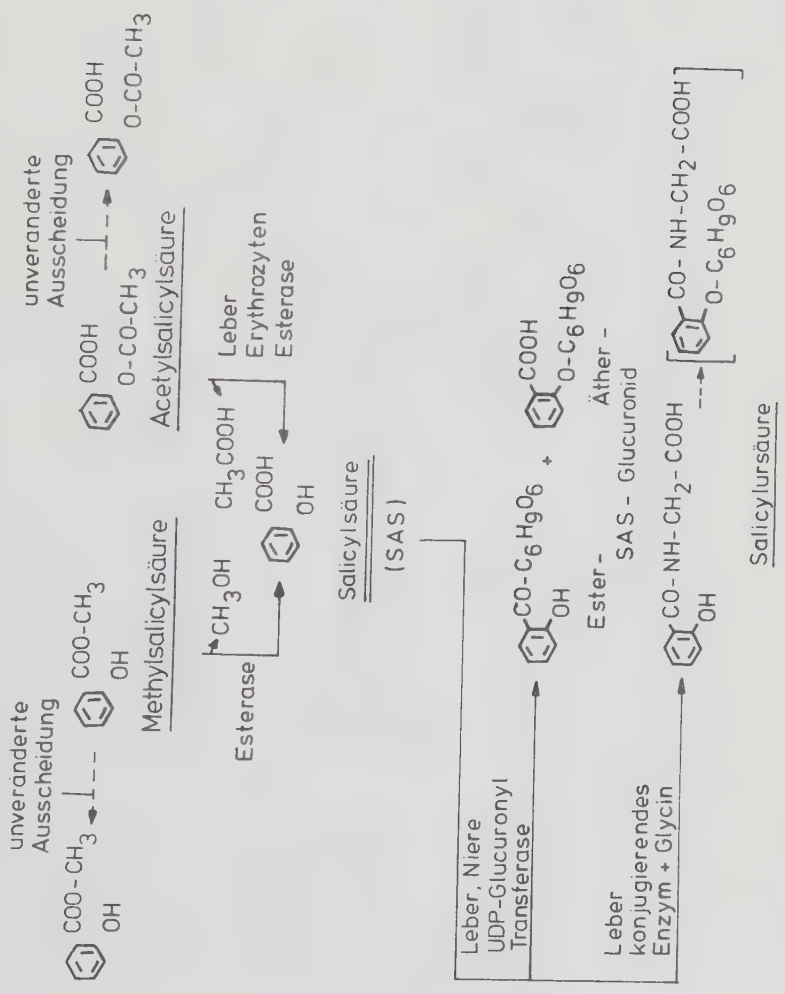
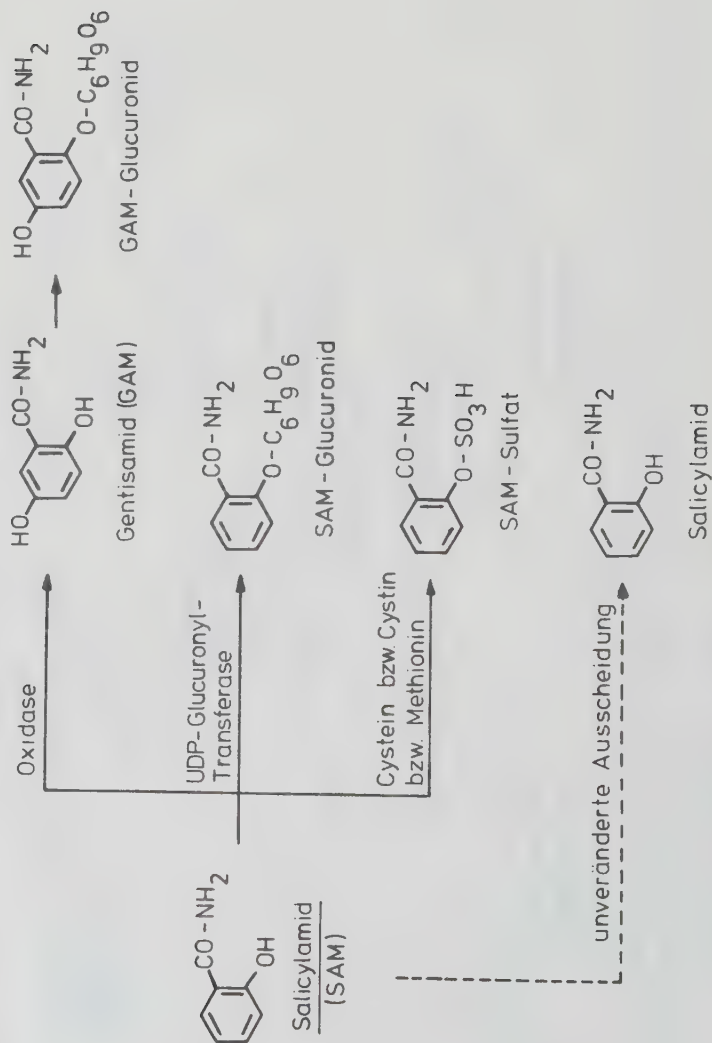


Abb. 4: Stoffwechsel des Salicylamids (mod. nach Geldmacher-v. Mallinckrodt, 1976)



Da nun wie o.a. bei hohen Salicylatspiegeln der Hauptausscheidungsmechanismus über die Salicylsäure selbst geht, diese als Säure bei saurem pH des Urins undissoziiert vorliegt und deshalb im distalen Tubulussystem in beträchtlichem Umfang rückresorbiert werden kann, spielt bei hohen Wirkspiegeln im Serum der pH-Wert des Urins den limitierenden Faktor. So ist es möglich die renale Salicylataclearance durch pH-Änderung von 5 auf 8 um das 20-fache zu steigern (Levy, 1976). Dies ist für die Therapie toxischer Erscheinungen durch Salicylate von großer Bedeutung und durch Alkalisieren des Urins gut ausnutzbar, wobei bis zu 85% des eingenommenen Medikaments auf diesem Weg beseitigt werden können.

3.5 NEBENWIRKUNGEN

Unter Nebenwirkungen sind hier vorwiegend unerwünschte Erscheinungen im therapeutischen Bereich zu verstehen, obwohl man sich darüber im klaren sein muß, daß die Übergänge zur Vergiftung fließend sind. Die einzelnen Wirkungen sowohl therapeutischer als auch toxischer Art in ihrem Dosisbezug sind der Abb. 5 zu entnehmen.

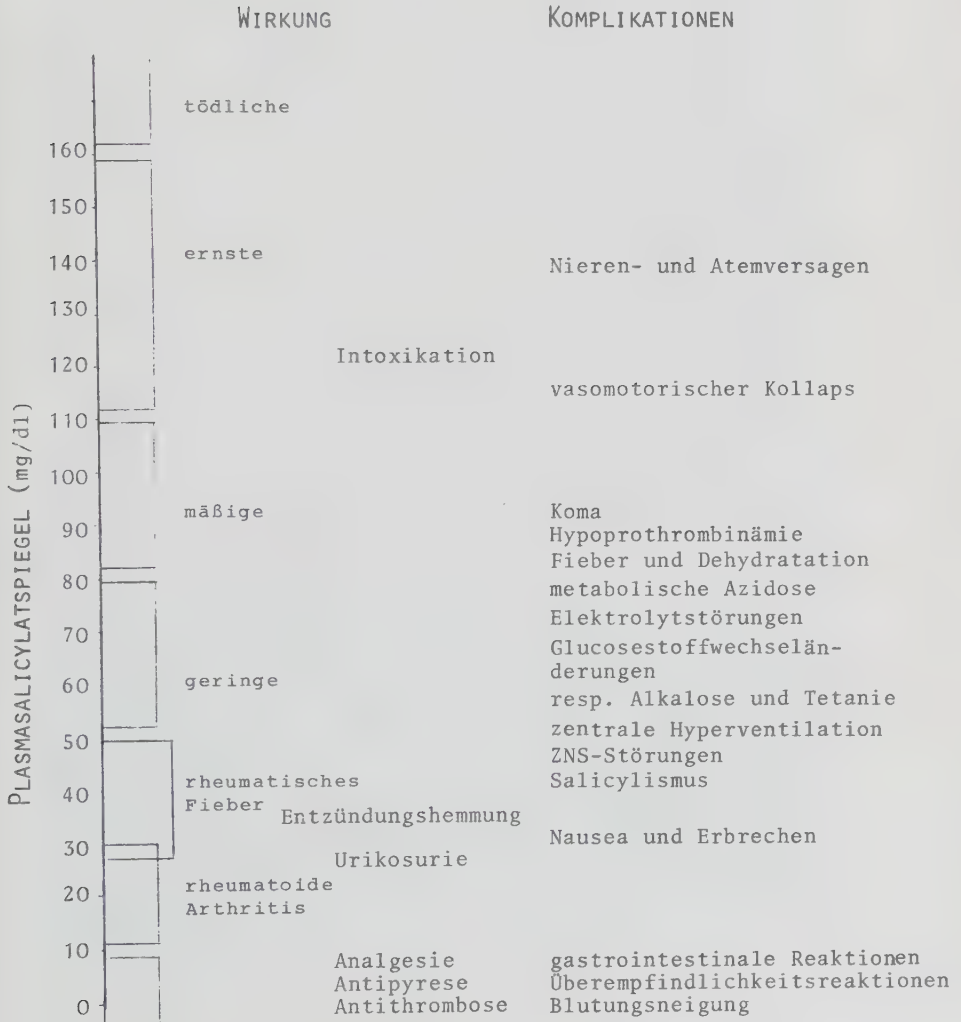
Die wohl häufigsten Nebenwirkungen der Salicylate sind von Seiten des Gastrointestinaltraktes zu erwarten. Hierbei handelt es sich um dyspeptische Beschwerden mit epigastrischen Schmerzen. Ferner treten bei 70 - 80% der Patienten unter Sa-

licylattherapie okkulte Blutungen im Bereich des Magens auf (Valman et al., 1968). Massive Blutungen finden sich hingegen wesentlich seltener und dann, ebenso wie Perforationen, meist im Zusammenhang mit vorbestehenden Magendarmulcera, die eine Kontraindikation zur Salicylattherapie bilden (Levy, 1974).

Außerdem sind unter Salicylattherapie die Entstehung von Magenulcera selbst, erosiver Gastritis und eines Pylorospasmus möglich. Die Erklärung dieser Komplikationen wird heute vorwiegend in der Hemmung der Prostaglandinsynthese vor allem des Typs E, der für die protektive Funktion der Schleimbildung, den Wasser- und Elektrolyttransport durch die Schleimhaut und die Motilität der glatten Muskulatur verantwortlich ist (Wilson, 1974), gesucht.

Unerwünschte Wirkungen auf die Niere bestehen zum einen in einer Natriumretention mit nachfolgender Vermehrung des Zirkulationsvolumens. Es entstehen Ödeme, woraus eine zunehmende kardiale Belastung und eine Blutdruckerhöhung resultieren. Auch hierfür zeichnet der Typ E der Prostaglandine bzw. dessen Hemmung verantwortlich. Zum anderen entwickeln sich unter Dauerbehandlung mit Salicylaten durch die Prostaglandinhemmung und die damit verbundene Blutverteilungsstörung zwischen Rinde und Mark Nierenschäden, die als Hämaturie, Albuminurie oder Papillennekrose imponieren. Durch die Natriumretention erfolgt eine Wirkungsabschwächung von Diuretika (Furosemid) und Antihypertonika (Schönhöfer, 1981).

Abb. 5: Ungefähre Beziehung des Plasmasalicylatspiegels zu Pharmakodynamik und Komplikationen (mod. nach Hollander und McCarty, 1972)



Übelkeit und Erbrechen sind Nebenwirkungen von Seiten des Zentralnervensystem (ZNS), die Plasmaspiegel von 27 mg/dl und mehr erfordern (*Bhargava et al.*, 1963). Noch höhere Wirkspiegel sind für dann auftretende Kopfschmerzen, Schwindel, Hörstörungen, Sehstörungen, Pseudotumor cerebri (bei Kindern), Konvulsionen, zentrale Erregungen und Psychosen hin bis zum Koma notwendig. Die Überschneidung von therapeutisch und toxisch bedingten Effekten wird hier besonders deutlich. Die beschriebenen ZNS-Störungen werden ebenfalls über den Prostaglandinhemmungsmechanismus und dessen Beeinflussung des Elektrolyttransportes durch die Zellmembran erklärt.

Der Respirationstrakt wird im therapeutischen Bereich durch die Bronchokonstriktion infolge Hemmung der Prostaglandinsynthese beeinträchtigt. Es ergibt sich das Bild des "Aspirin-Asthas" (*Sacseklik*, 1977). Eine alveoläre Hyperventilation wird fast ausnahmslos bei Intoxikationen beschrieben. Weitere unerwünschte Wirkungen in Verbindung mit der Hemmung der Prostaglandine sind die Kontraktionshemmung des Uterus und die durch vorzeitigen Schluß des Ductus arteriosus Botalli zustandekommende primäre pulmonale Hypertonie bei Neugeborenen. Weiterhin kann sich der physiologische Ikterus neonatorum durch die Verdrängung von Bilirubin aus seiner Bindung an Albumin bis zum Kernikterus und seinen schwerwiegenden Folgen für das Neugeborene entwickeln. Nebenwirkungen auf das hämatologische System sind die Thrombozytenaggregationshemmung - wieder über die Prostaglandine - ,

in höheren Dosen, d.h. ab ca. 6g/die, eine Hypoprothrombinämie und bei chronischer Salicylataufnahme eine mikrozytäre Anämie durch Blutverlust über den Gastrointestinaltrakt und wahrscheinliche Wechselwirkung mit dem Eisenstoffwechsel (Goodman und Gilman, 1970). Bei Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel kann sich, ausgelöst durch Acetylsalicylsäure oder ihren Metaboliten 2,5-Dihydroxybenzoesäure, eine schwere Anämie entwickeln (Petrin und Schmidt, 1973). Des weiteren sind thrombozytopenische Purpura und Panzytopenien nach Gabe von Acetylsalicylsäure beschrieben worden (Wijnja et al., 1966). Deshalb ist bei der Anwendung von Salicylaten in Verbindung mit Hämophilie, Willebrand-Krankheit, Teleangiektasien, Herzkrankheiten und Antikoagulationstherapie besondere Vorsicht geboten. Ein ungeklärter Effekt auf die Leber beruht auf der choleretischen Wirkung der Salicylate. Außerdem ist der Mechanismus der fettigen Infiltration der Leber bei schweren Intoxikationen unbekannt.

Störungen im Säure-Base-Haushalt, im Wasser- und Elektrolytstoffwechsel wie die respiratorische Alkalose, die metabolische Acidose, die Dehydratation und Hypokaliämie treten meist erst bei Intoxikationen auf und lassen sich größtenteils über die Prostaglandinsynthesehemmung erklären. Auch die meisten Wirkungen auf den Stoffwechsel sind nahezu ausschließlich im toxischen Dosisbereich sichtbar (siehe dort).

Die Häufigkeit von Intoleranzreaktionen in bezug auf Salicylate beträgt 0,2 - 0,9%, bei Patienten mit allergischen Erkrankungen in der Anamnese jedoch 3 - 5% (*Biesterfeld et al.*, 1978). Folgen dieser Reaktionen können Asthma (s.o.), Urtikaria, Exantheme, Periarteriitis, Fieber, Quincke-Ödem, Rhinitis vasomotorica und schließlich der anaphylaktische Schock sein (*Saxl*, 1971). Ein Teil der aufgeführten Erscheinungen dürfte jedoch auch auf das stark immunogen wirkende Acetylsalicylsäureanhydrid zurückzuführen sein, mit dem manche Acetylsalicylsäurepräparationen kontaminiert sind (*de Week*, 1971).

Endokrinologisch vermögen die Salicylate über die Aktivierung hypothalamischer sympathischer Zentren das Nebennierenmark zur Freisetzung von Adrenalin zu veranlassen (*Batterman*, 1959).

Ferner induzieren sie über einen erhöhten ACTH-Spiegel mit Wirkung auf die Nebennierenrinde ein vorübergehendes Cushing-Syndrom (*Hetzel und Hine*, 1951). Bis zu einem gewissen Grad blockieren Salicylsäurepräparate aber auch die Aldosteronwirkung (*Elliot*, 1962).

Eine Herabsetzung der Schilddrüsenfunktion schließlich erfolgt über die Verminderung von PBJ als Folge von Wechselwirkungen an Plasmaproteinen zwischen Thyroxin und Salicylat (*Wolff*, 1958).

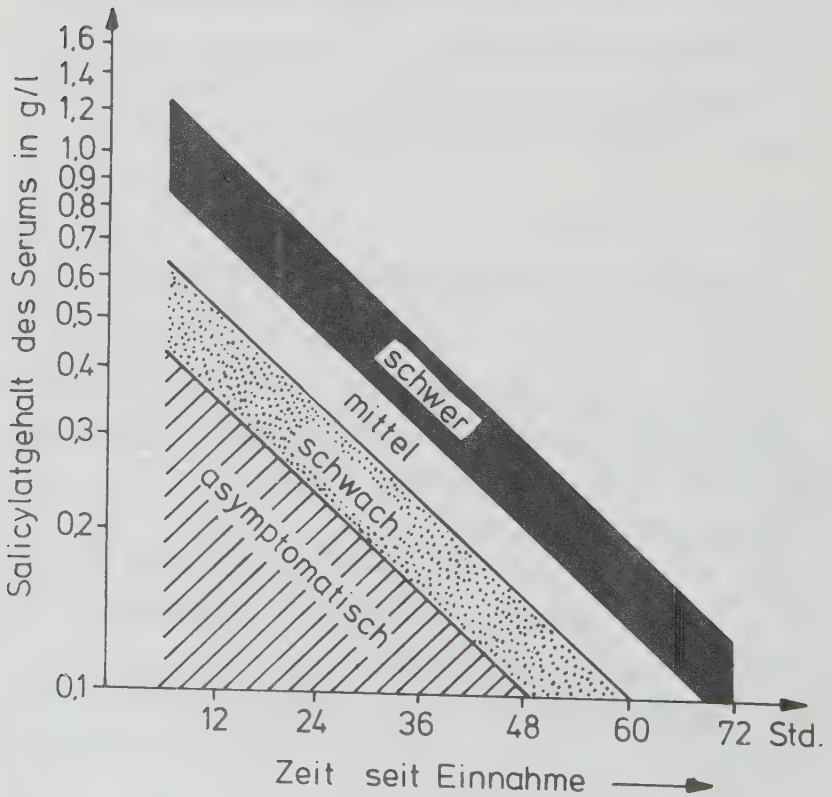
Last not least sei noch auf die Teratogenität der Salicylate verwiesen, die im Tierversuch seit langem bekannt ist (*Sloane et al.*, 1976). *Bove et al.*, (1979) zeigen dies anhand einer

Primapara von 20 Jahren, die im 2. Monat einen Suizidversuch mit 19 g Aspirin[®] unternahm. Der Knabe wog 3200 g. Mit 7 Jahren mußten dem Kind beide Nieren entfernt werden, da sie diffuse tubulopapilläre Adenome enthielten, die im Zusammenhang mit dem durchgeführten Suizidversuch stehen dürften. Jedoch ist nicht nur bei toxischen Dosen, sondern auch bei therapeutischer Anwendung von Acetylsalicylsäure mit teratogenen Effekten und einer erhöhten Totgeburtenrate zu rechnen, weshalb eine Anwendung während der Schwangerschaft mit äußerster Zurückhaltung zu betrachten ist.

4. TOXIKOLOGIE UND THERAPIE DER SALICYLATVERGIFTUNG

Intoxikationen durch Salicylate treten im Säuglings- und Kindesalter vorwiegend unbeabsichtigt auf und stellten in den USA eine der häufigsten Vergiftungsarten in dieser Altersgruppe dar. Bei Jugendlichen und Erwachsenen liegt im Falle einer Intoxikation meist suizidale Absicht vor. Die Schwere der jeweiligen Vergiftung hängt von der aufgenommenen Menge und somit letztlich vom Plasmasalicylatspiegel ab. Darüberhinaus ist vor allem noch die nach Einnahme des Wirkstoffes verstrichene Zeit ein maßgeblicher und nicht zu unterschätzender Faktor. Den Zusammenhang Zeit - Serumsalicylatspiegel verdeutlicht die Abb. 6.

Abb. 6: Nomogramm zur Einstufung von Salicylatvergiftungen unter Berücksichtigung des Zeitabstandes zwischen Drogeneinnahme und Messung des Serumsiegels (nach Done, 1960)



Als letale Dosis werden aufgrund verschiedener in der Literatur angegebener Werte für Salicylsäure 3 - 12 g, für Natriumsalicylat 10 - 30 g und für Acetylsalicylsäure 10 - 30 g oder mehr angenommen. Jedoch wurden im Einzelfall schon wesentlich höhere Aspirinaufnahmen überlebt, was *Savege et al.* (1969) anhand eines 36-jährigen Mannes, der 90 g Acetylsalicylsäure eingenommen hatte, zeigen konnten.

Leichte Intoxikationserscheinungen treten schon bei therapeutischen Dosen von 8 - 12 g/die auf, die beim Gelenkrheumatismus zur Anwendung kommen. Das zeigt - wie oben angeführt - den fließenden Übergang von Therapie zur Toxizität. Es kommt dabei zu Nausea, Erbrechen, Magenschmerzen, Schwindel und Ohrensausen mit Herabsetzung der Hörfähigkeit. Diese Symptome werden unter dem Begriff des Salicylismus zusammengefaßt und weisen den Kliniker daraufhin, daß sich sein Patient dem toxischen Bereich stark genähert hat. Die Serumspiegel liegen dabei meist zwischen 35 und 50 mg/dl.

Bei höheren Dosen kommt es durch direkte Reizung des Atemzentrums zur Atemnot mit nachfolgender Hyperventilation vom acidotischen Typus. Differentialdiagnostisch ist hierbei ein Koma diabeticum auszuschließen, umso mehr als bei schweren Vergiftungen Aceton und Eiweiß im Urin ausgeschieden werden. Die Hyperventilation führt schließlich zur respiratorischen Alkalose und über eine vermehrte Bikarbonatausscheidung im Urin vor allem bei Kindern zu einer metabolischen Acidose. Bei Erwachsenen überwiegt meist die respiratorische Alkalose, es sei denn es bestünden renale Komplikationen oder eine chro-

nische Intoxikation. Patienten mit Salicylatvergiftung schwitzen, sind unruhig, reizbar und verwirrt, später somnolent. Es kann zu Hyperthermie mit rotem Gesicht und Exsikkose kommen. Blutungen durch Prothrombinsynthesestörungen können das Bild komplizieren. Gefahren sind vor allem Kollaps und Koma, die terminal auftreten. Außerdem ist auf typische schwere Hypokaliämien zu achten, die charakteristische EKG-Veränderungen hervorrufen. Hypoglykämien finden sich vorwiegend bei Kindern, müssen aber auch bei Erwachsenen Berücksichtigung erfahren. Eine weitere Gefahr stellt die Entwicklung eines Lungenödems durch die Prostaglandinsynthesehemmung dar. Letztlich ist noch auf die Möglichkeit eines Atemstillstandes zu achten.

Für die Diagnose einer Salicylsäurevergiftung entscheidend sind die HOCHGRADIGE HYPERPNOE UND ATEMNOT MIT STARKEM SCHWITZEN BEI FEHLEN EINER EIGENTLICHEN ZYANOSE oder eines kardialen oder pulmonalen Prozesses, die die Atemnot zu erklären vermögen.

Als therapeutisches Vorgehen empfiehlt sich bei oraler Aufnahme die Magenspülung mit Zusatz von Tierkohle, wobei am Schluß durch eine liegende Sonde 30 mg Rizinusöl eingebläst werden sollen. Die Magenspülung ist auch noch nach Stunden sinnvoll, da bei der Salicylatvergiftung die Magenentleerung durch das Auftreten eines Pylorospasmus verzögert ist.

Bei Kindern wird in leichten Fällen empfohlen die weitere Resorption durch die Gabe eines Emetikums wie Ipecacuanhae

und mittels einer Tierkohlesuspension (20 g pro 100 ml), die man als 70%-ige Sorbitollösung gibt, welche Kinder, da sie süß ist, ohne Widerwillen trinken, zu verhindern (*Berg*, 1978, *Meyersohn et al.*, 1977).

Bei Erwachsenen empfiehlt sich in leichten Fällen die i.v.-Infusion von isotonischer Natriumbikarbonatlösung unter ständigen pH-Messungen, da eine Alkalisierung zu einer Hemmung des Atemantriebes mit Folge einer Atemlähmung führen würde. Schwere Fälle erfordern eine verstärkte Therapie in Form der forcierten alkalischen Diurese mit adäquatem Kaliumzusatz. Für diese sog. Cocktailtherapie eignen sich

physiologische NaCl	0,9 %	500 ml
Laevulose	5 %	1000 ml
Natriumbikarbonat	1,26%	500 ml
Kaliumchlorid		3 g

als Mischung, wobei über drei Stunden 2 l/h i.v. verabreicht werden (*Lawson et al.*, 1969). Diese forcierte Diurese bewirkt eine rasche Abnahme des Salicylatspiegels, eine pH-Korrektur und verhütet durch die stündliche Zufuhr von 40 mval Kalium die gefürchtete Hypokaliämie. Bei einem evtl. entstehenden Lungenödem sind elektrolythaltige Lösungen kontraindiziert, da sie die Symptomatik verstärken. Demgegenüber sind kolloidale Lösungen wie Plasma (25% Albumin) im Gegensatz zum kardial bedingten Lungenödem therapeutisch gut geeignet. Eine Blutungsgefahr wird durch die i.v.-Applikation von 2 Ampullen Konaktion[®],

besser jedoch in die Infusion, unterbunden.

In schwersten Fällen finden die Hämodialyse, bei der die Salicylate ca. 5 - 10 mal schneller aus dem Körper entfernt werden als bei der forcierten Diurese, und die Blutaustauschtransfusion, vor allem bei Kindern, Anwendung. Auch die Peritonealdialyse mit und ohne Zusatz von 5% Albumin wird eingesetzt, obwohl sie verglichen mit der forcierten Diurese keine beschleunigte Salicylatelimination ergibt (*Tschetter*, 1963, *Berg*, 1978). Weitere Vergiftungserscheinungen wie Hyperthermie, Krämpfe und Atemstillstand werden symptomatisch behandelt. Es ist jedoch zu beachten, daß keine atemdepressorisch wirkenden Pharmaka verwendet werden.

Zu begrüßen ist die 1968 in den USA eingeführte Verwendung von Sicherheitsverschlüssen für Arzneimittel und andere toxische Substanzen, so daß die unbeabsichtigten Intoxikation von Kindern bis zum 5. Lebensjahr deutlich zurückgegangen sind. Auch den Pharmaindustrien anderer Länder, z.B. der Bundesrepublik wären derartige Sicherheitsmaßnahmen dringend anzuraten.

II. PROBLEMSTELLUNG

Ziel dieser Arbeit soll es sein, Pierce Rapid Stat[®] Diagnostic Kit - ein Reagensverfahren zur quantitativen photometrischen Bestimmung von Salicylat im Serum - auf seine Eignung als klinisch-chemischen Suchtest hin zu überprüfen. Hierbei soll seine Genauigkeit bzw. seine Zuverlässigkeit in der klinischen Chemie anhand von Eichkurven in wässrigem Milieu, in Serum und auch in Urin aufgezeigt und der Methode nach *Trinder* (1954) gegenübergestellt werden.

Darüberhinaus soll noch untersucht werden, ob sich mit dieser Methode die Salicylursäure - ein Hauptausscheidungsprodukt der Salicylsäure - im Urin nachweisen läßt.

Ferner wird auf einige chemische Verbindungen einzugehen sein, die mit dem dargestellten Reagensverfahren interferieren.

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. GEWINNUNG UND AUFBEWAHRUNG VON SERUM UND URIN

Zur Gewinnung des Serums wurden 500 ml Eigenblut entnommen. Nach Gerinnungseintritt wurde durch schonendes Zentrifugieren bei 3000 U/Min., Dauer 15 Min., um eine Zerstörung der Erythrozytenmembranen und der damit verbundenen Freisetzung des Blutfarbstoffes zu verhindern, das Serum abgetrennt. Hernach wurde das Serum in Portionen von ca. 6 ml bei -20°C eingefroren und erst unmittelbar vor der Erstellung der Meßreihen wieder aufgetaut.

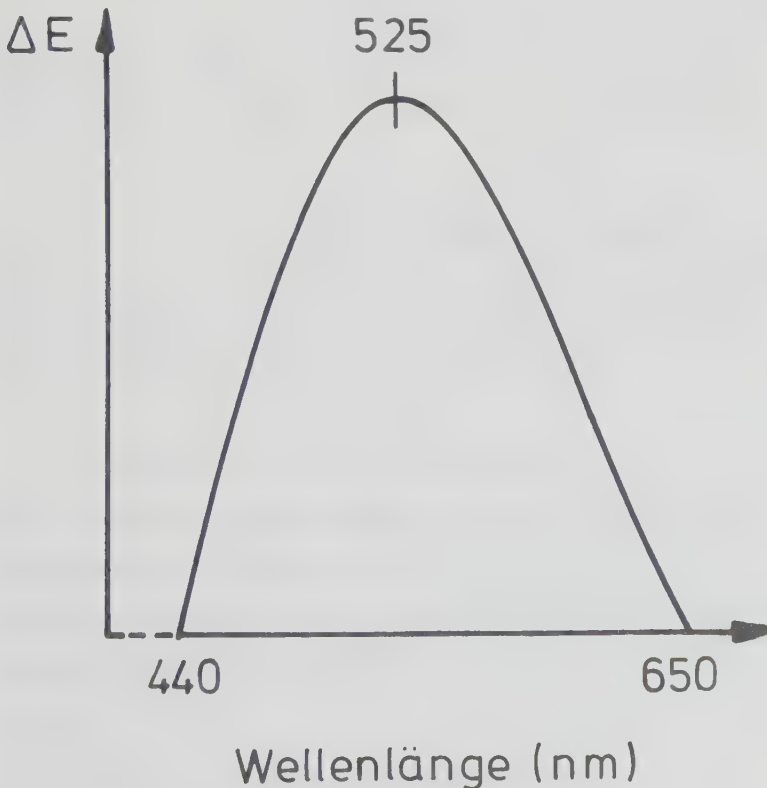
Als Urin kam Eigenurin, der kurz vor der Herstellung der Meßreihen gewonnen und auf Zimmertemperatur abgekühlt wurde, zur Anwendung. Durch die Tatsache, daß der Urin nicht einheitlich war, wie er es durch Einfrieren einer größeren Menge hätte sein können, konnte ein weiterer Umstand in die Untersuchungen eingebracht werden, nämlich die Abhängigkeit der Messung von Salicylsäure und ihrer Derivate im Urin vom unterschiedlichen Konzentrierungsverhalten der Niere. Deshalb erschien uns diese Art der Uringewinnung angemessen.

2. MESSUNG DER EXTINKTION

Vor der Messung der Salicylat-Extinktionen nach der Methode von Pierce erfolgte an dem von uns verwendeten Spektralphotometer mit angeschlossenen Schreiber die Bestimmung des Extink-

tionsmaximums. Hierzu wurden von einer 100 mg/dl enthaltenden wässrigen Salicylatlösung, die entsprechend der Anleitung nach Pierce (s.u.) verarbeitet wurde, 12 Extinktionskurven im Bereich zwischen 400 - 700 nm vom Schreiber aufgezeichnet. Das hierbei ermittelte mittlere Extinktionsmaximum lag bei $\lambda = 525$ nm (s.Abb. 7). Demzufolge wurden all unsere Messungen - ausgenommen die der Methode nach Trinder - bei $\lambda = 525$ nm durchgeführt.

Abb. 7: Darstellung des Extinktionsmaximums für das von uns verwendete Spektralphotometer



Lösungen:

Farbreagens (150 ml):

Nach Angaben des Herstellers beinhaltet das Farbreagens folgende Substanzen:

H_2SO_4 0,44%

$FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ 0,5 %

Na-Wolframat-Dihydrat 0,6 %

sowie einen nicht näher benannten Stabilisator.

Salicylatstandard 25 mg/dl (7,5 ml):

Dieser enthält nach Herstellerangaben 29 mg/dl Na-Salicylat entsprechend 25 mg/dl Salicylat. Außerdem ist ein Konservierungsmittel enthalten.

Salicylatstandard 400 mg/dl (7,5 ml):

Wiederum gemäß Herstellerangaben sind 463,7 mg/dl Na-Salicylat entsprechend 400 mg/dl Salicylat enthalten. Ebenso findet sich ein Konservierungsmittel wieder.

Diese drei Substanzen beinhaltet der Rapid Stat[®] Diagnostic Kit von Pierce. Aufbewahrt werden soll der Kit bei Zimmertemperatur. Das Haltbarkeitsdatum ist jeder Packung aufgedruckt. Die jeder Packung beiliegenden Hinweise sowie die Arbeitsanleitung in englischer Sprache finden sich als Anhang zu dieser Arbeit auf Seite 89.

Weitere Lösungen:

Trispuffer 0,227 M:

2,75 g TRIS (Tris-hydroxymethyl-amino-methan) abwiegen, etwa 80 ml Aqua bidest. zugeben. So lange mit Magnetrührer rühren, bis alles TRIS gelöst ist. Dann mit Aqua bidest. auf 100 ml auffüllen.

Salicylat-Stammlösung 10 g/dl und 5 g/dl Salicylatlösung:

11,68 g Na-Salicylat abwiegen und in etwa 80 ml Aqua bidest. mittels Magnetrührer lösen. Anschließend mit Aqua bidest. auf 100 ml auffüllen. Dies entspricht einer 10 g/dl Salicylatlösung, die von uns als Stammlösung zugrundegelegt wird. Mit einigen Tropfen Chloroform versetzt ist die Lösung im Kühlschrank mehrere Monate haltbar.

Aus technischen Gründen findet ferner eine 5 g/dl Salicylatlösung, die aus der 10 g/dl Salicylat-Stammlösung und Aqua bidest. im Verhältnis 1:1 hergestellt wird und in den folgenden Tabellen durch *Kursivschrift* gekennzeichnet ist, Anwendung.

Trinders Reagens (Trinder, 1954):

4 g HgCl_2 werden in 75 ml Aqua bidest. unter Erhitzen gelöst. 12 ml 1 m HCl und 4 g Fe (III)-nitrat werden nach dem Abkühlen hinzugegeben und mit dem Magnetrührer in Lösung gebracht. Anschließend füllt man mit Aqua bidest. auf 100 ml auf. In einer Polyäthylenflasche aufbewahrt ist die Lösung bei Raumtemperatur praktisch unbegrenzt haltbar.

Salicylursäure-Stammlösung 1 g/dl:

1 g Salicylursäure wird in 70 ml Äthanol und 30 ml Aqua bidest nach und nach gelöst. Die entstehende Stammlösung von 1 g/dl Salicylursäure ist wegen der Flüchtigkeit des Äthanolis dicht verschlossen zu halten und schnell zu verarbeiten.

Die Herstellung der Salicylat- und Salicylursäurestandards bzw. der jeweiligen Gebrauchslösungen unterschiedlicher Konzentration wird in den einzelnen Abschnitten gesondert dargestellt.

Ansatz und Messung nach Pierce:

In ein Reagenzglas werden pipettiert:

0,2 ml Gebrauchslösung sprich Standard,

2 ml Aqua bidest. zugeben und gut mischen,

2 ml Farbreagens zugeben und sofort mischen,

5 Min. bei 2000 U/Min. zentrifugieren. .

Überstand in Küvette überführen und bei $\lambda = 525$ nm gegen Leerwert, der durch 0,2 ml Aqua bidest., Normalserum oder Normalurin anstelle der Gebrauchslösung gewonnen wird, messen.

Ansatz und Messung nach Trinder:

In ein Reagenzglas werden pipettiert:

1 ml Gebrauchslösung,

4 ml Farbreagens zugeben und gut mischen

5 Min. bei 2000 U/Min. zentrifugieren.

Überstand in Küvette geben und bei $\lambda = 530$ nm gegen Leerwert, d.h.

1 ml Normalserum anstatt 1 ml Gebrauchslösung, messen.

3. BERECHNUNG UND RICHTIGKEITSKONTROLLE

Die Berechnung einer unbekannten Konzentration Salicylat erfolgt nach Pierce mit nachstehender Formel:

$$x = \frac{\Delta E_u}{\Delta E_{25 \text{ mg/dl Standard}}} \cdot 25 \text{ mg/dl}$$

$x \hat{=}$ unbekannte Salicylatkonzentration in mg/dl

$u \hat{=}$ unbekannt.

Der 25 mg/dl Standard wurde nun von uns mehrmals gemessen und zeigte dabei eine mittlere Extinktion von 0,1.

Hierdurch wird die obenangeführte Formel wie folgt vereinfacht:

$$\text{Faktor: } \frac{25 \text{ mg/dl}}{0,1} = \underline{\underline{250 \text{ mg/dl}}}$$

$$x = \Delta E_u \cdot 250 \text{ mg/dl}$$

Beispiel: $\Delta E_u = 0,401$ (s. Tab. 3)

$$x = 0,401 \cdot 250 \text{ mg/dl} = 100,25 \text{ mg/dl}$$

Im Ansatz waren 100 mg/dl.

Der prozentuale Fehler (F%) kann jetzt über die Formel

$$F\% = \frac{|(\text{Sollwert} - \text{Istwert})| \cdot 100}{\text{Sollwert}}$$

errechnet werden.

$$\text{Beispiel: } F\% = \frac{|(100 - 100,25)| \cdot 100}{100} = 0,25\%$$

Eine derartige prozentuale Fehlerrechnung kann bei bekannter Ausgangskonzentration gleichzeitig als Richtigkeitskontrolle dienen, wobei nach den Richtlinien der Bundesärztekammer ein maximaler Fehler von 10% erlaubt ist.

4. PRÄZISIONSKONTROLLE

Zur Präzisionskontrolle wurden pro Meßreihe entweder eine oder zwei Konzentrationen sprich Gebrauchslösungen 12 mal angesetzt und gemessen. Mittelwert (M), Standardabweichung (s), und Variationskoeffizient (Vk) wurden bestimmt.

Nach den Richtlinien der Bundesärztekammer darf der Variationskoeffizient, d.h. der prozentuale Anteil der Standardabweichung am Mittelwert, bei chemischen Analysen 5% nicht übersteigen.

Darüberhinaus wurde zur Veranschaulichung der Ergebnisse der Korrelationskoeffizient (r) für die Beziehung Gebrauchslösung - mit bekannter Konzentration - und Extinktion für jeweils eine Meßreihe bestimmt.

5. ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN

Bevor der eigentliche Teil der Ergebnisse zur Darstellung kommt, hier noch einige Vorbemerkungen. Es sei nochmals darauf verwiesen, daß neben der o.a. 10 g/dl Salicylatstamm-

stammlösung aus technischen Gründen eine 5 g/dl Salicylatlösung, die aus ersterer hergestellt wurde und durch *Kurvenschrift* gekennzeichnet ist, verwendet wurde. ΔE_M resultiert aus zwei bzw. zwölf (Präzision) gemessenen Ansätzen innerhalb einer Meßreihe. Dieser Wert ist für die entsprechenden Abbildungen maßgeblich. Der Korrelationskoeffizient (r) beinhaltet die jeweiligen Zusammenhänge (s.o.) bis einschließlich 250 mg/dl.

5.1 Salicylateichkurven in wässriger Lösung (Methode nach Pierce)

Tab. 1 gibt die Ergebnisse der ersten Meßreihe im wässrigen Milieu sowie die Zusammensetzung der Gebrauchslösungen bzw. Konzentrationen wieder. Des weiteren sind die errechnete Konzentration und der prozentuale Fehler (F% s.o.) aufgeführt. Der Korrelationskoeffizient $r = 0,99$ zeigt den hochsignifikanten Zusammenhang zwischen Konzentration auf der einen und Extinktion auf der anderen Seite. 12 Messungen bei 175 mg/dl ergeben folgende Werte zur Präzision:

$$M = 0,704$$

$$s = 0,003$$

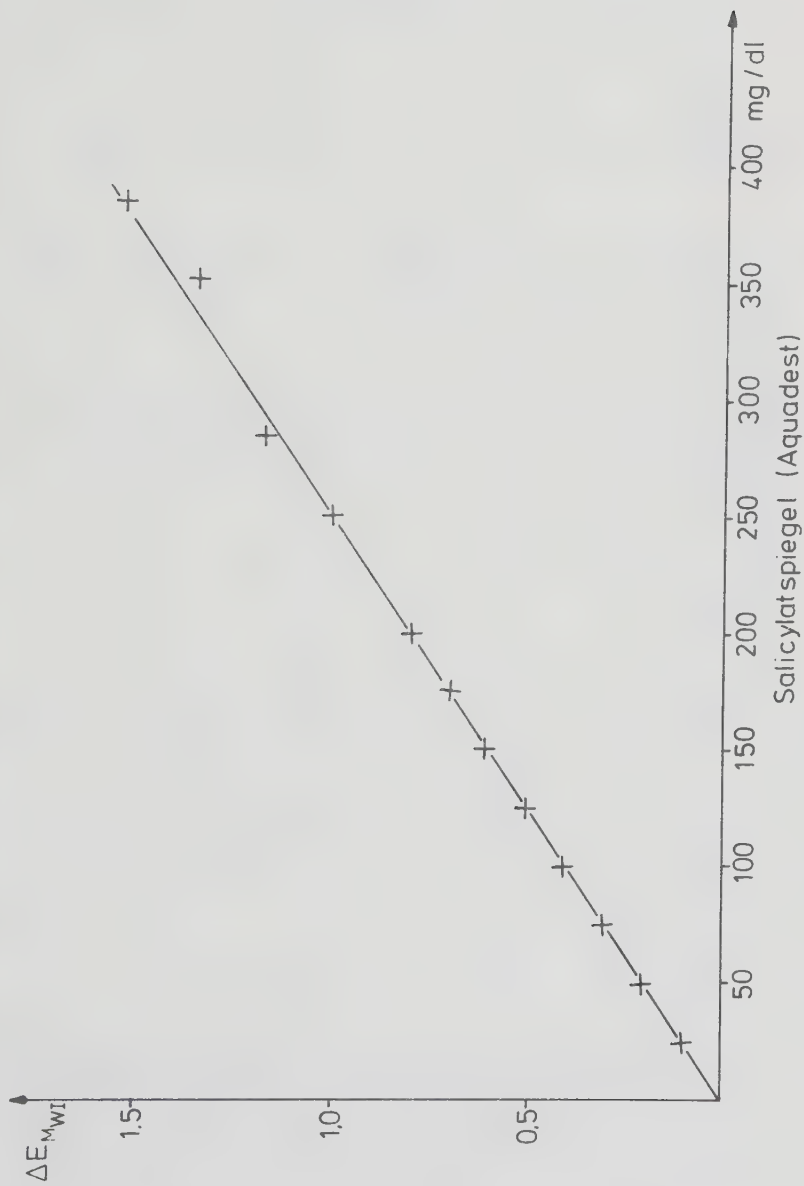
$$V_k = 0,43 \, \%$$

Tab. 1: Ergebnisse von Untersuchungen zur Salicylatbestimmung nach der Methode von Pierce im wässrigen Milieu I (*kursiv* 5 g/dl Salicylatlösung)

Konz. (mg/dl)	Stammlsg. (ml)	H ₂ O(ml)	Tris (ml)	$\Delta E_{M_{WI}}$	errechn.Konz. (mg/dl)	F%
25	0,05	4,95	5	0,1	25	0
50	0,05	4,95	5	0,205	51,25	2,5
75	0,15	4,85	5	0,304	76	1,33
100	0,1	4,9	5	0,415	103,75	3,75
125	0,25	4,75	5	0,508	127	1,6
150	0,15	4,85	5	0,614	153,5	2,33
175	0,35	4,65	5	0,704	176	0,57
200	0,2	4,8	5	0,804	201	0,5
250	0,25	4,75	5	1,01	252,5	1
300	0,3	4,7	5	1,187	296,75	1,08
350	0,35	4,65	5	1,358	339,5	3
400	0,4	4,6	5	1,54	385	3,75

Die graphische Darstellung der Ergebnisse ist Abb. 8 zu entnehmen.

Abb. 8: Salicylateichkurve in wässrigem Milieu I nach der Methode von Pierce



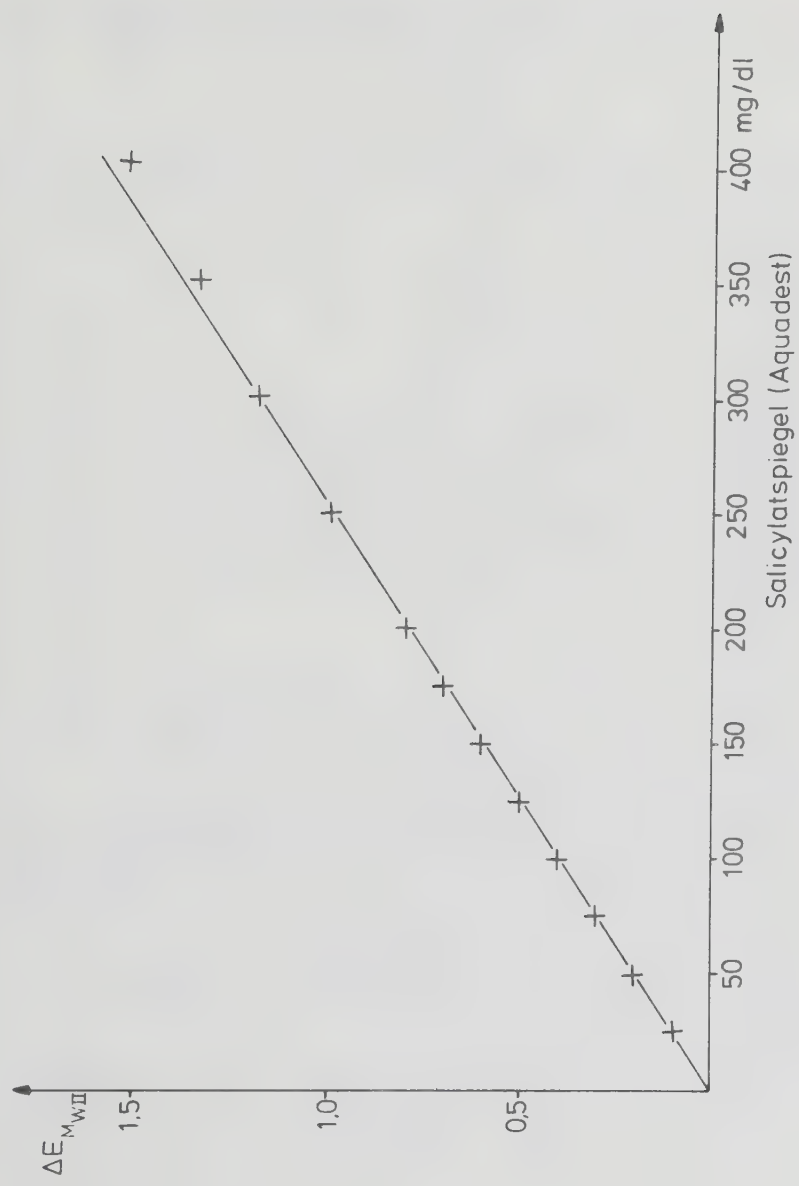
Zur Überprüfung der ersten Salicylateichkurve in wässriger Lösung und zur Überprüfung verschiedener diagnostischer Packungen der Firma Pierce wurde für die zweite Meßreihe und mithin die zweite Eichkurve für Salicylat in wässriger Umgebung ein anderer Kit verwendet. Die Ergebnisse faßt Tab. 2 zusammen.

Tab. 2: Ergebnisse von Untersuchungen zur Salicylatbestimmung nach der Methode von Pierce in wässrigem Milieu II
(*kursiv* 5 g/dl Salicylatlösung)

Konz. (mg/dl)	Stammlsg. (ml)	H ₂ O(ml)	Tris (ml)	$\Delta E_{M_{WII}}$	errechn.Konz. (mg/dl)	F%
25	0,05	4,95	5	0,099	24,75	1
50	0,05	4,95	5	0,204	51	2
75	0,15	4,85	5	0,301	75,25	0,33
100	0,1	4,9	5	0,408	102	2
125	0,25	4,75	5	0,508	127	1,6
150	0,15	4,85	5	0,61	152,5	1,66
175	0,35	4,65	5	0,707	176,75	1
200	0,2	4,8	5	0,804	201	0,5
250	0,25	4,75	5	1,007	251,75	0,7
300	0,3	4,7	5	1,19	297,5	0,83
350	0,35	4,65	5	1,35	337,5	3,57
400	0,4	4,6	5	1,527	381,75	4,56

Der Korrelationskoeffizient ist mit $r = 1,00$ ebenso hochsignifikant wie bei der ersten Meßreihe. Die weitgehende Übereinstimmung der beiden Eichkurven in Aqua dest. verdeutlicht auch Abb. 9.

Abb. 9: Salicylateichkurve in wässrigem Milieu II nach der Methode von Pierce



Die Präzision der vorgenannten Meßreihe beträgt bei 25 mg/dl

$$M = 0,099$$

$$s = 0,002$$

$$Vk = 2,02 \%$$

und bei 200 mg/dl

$$M = 0,804$$

$$s = 0,003$$

$$Vk = 0,37 \%$$

Nachdem die Anwendbarkeit des Diagnostic Kits von Pierce zum Zwecke der Salicylatbestimmung in wässrigem Milieu durch die obenangeführten beiden Meßreihen hinreichend bewiesen ist, sei jetzt auf die wohl wesentlichere Salicylatbestimmung im Serum eingegangen.

5.2 Salicylateichkurven im Serum (Methode nach Pierce)

Auch hier wurden zwei Meßreihen von verschiedenen Kits - ähnlich wie bei der Darstellung in wässrigem Milieu - durchgeführt. Die Gebrauchslösungen bestehen - abgesehen von der Stammlösung - ausschließlich aus Serum. Die Ergebnisse sind den Tabellen 3 und 4 zu entnehmen.

Die Präzision der ersten Meßreihe im Serum zeigt bei 175 mg/dl

$$M = 0,699$$

$$s = 0,008$$

$$Vk = 1,14 \%$$

Tab. 3: Ergebnisse von Untersuchungen zur Salicylatbestimmung nach der Methode von Pierce im Serum I
(*kursiv 5 g/dl Salicylatlösung*)

Konz. (mg/dl)	Stammlsg. (ml)	Serum (ml)	$\Delta E_{M_{SI}}$	errechn.Konz. (mg/dl)	F%
25	<i>0,05</i>	9,95	0,104	26	4
50	0,05	9,95	0,205	51,25	2,5
75	<i>0,15</i>	9,85	0,297	74,25	0,33
100	0,1	9,9	0,401	100,25	0,25
125	<i>0,25</i>	9,75	0,504	126	0,8
150	0,15	9,85	0,604	151	0,66
175	<i>0,35</i>	9,65	0,699	174,75	0,14
200	0,2	9,8	0,806	201,5	0,75
250	0,25	9,75	0,992	248	0,8
300	0,3	9,7	1,163	290,75	3,08
350	0,35	9,65	1,298	324,5	7,28
400	0,4	9,6	1,516	379	5,25

Bei der zweiten Meßreihe gliedert sich die Präzision wie folgt auf:

25 mg/dl: $M = 0,105$
 $s = 0,003$
 $V_k = 2,86 \%$

200 mg/dl: $M = 0,807$
 $s = 0,024$
 $V_k = 2,97 \%$

Tab. 4: Ergebnisse von Untersuchungen zur Salicylatbestimmung nach der Methode von Pierce im Serum II
(*kursiv* 5 g/dl Salicylatlösung)

Konz. (mg/dl)	Stammlsg. (ml)	Serum (ml)	$\Delta E_{M_{SII}}$	errechn. Konz. (mg/dl)	F%
25	0,05	9,95	0,105	26,25	5
50	0,05	9,95	0,209	52,25	4,5
75	0,15	9,85	0,303	75,75	1
100	0,1	9,9	0,406	101,5	1,5
125	0,25	9,75	0,502	125,5	0,4
150	0,15	9,85	0,612	153	2
175	0,35	9,65	0,692	173	1,14
200	0,2	9,8	0,807	201,75	0,85
250	0,25	9,75	0,974	243,5	2,6
300	0,5	9,7	1,122	280,5	6,5
350	0,35	9,65	1,287	312,75	8,07
400	0,4	9,6	1,561	390,25	2,44

Die Korrelationskoeffizienten sind für beide Ansätze hochsignifikant, mit $r = 1,00$ für den ersten und $r = 0,99$ für den zweiten Ansatz. Darüberhinaus zeigen die Abbildungen 10 und 11 die große Ähnlichkeit beider Meßreihen und belegen die Eignung des Kits für diagnostische Zwecke der Salicylatbestimmung im Serum. Außerdem lassen die Ergebnisse im Serum ein hohes Maß an Übereinstimmung mit den Ergebnissen im wässrigen Milieu erkennen.

Abb. 10: Salicylateichkurve im Serum I nach der Methode von Pierce

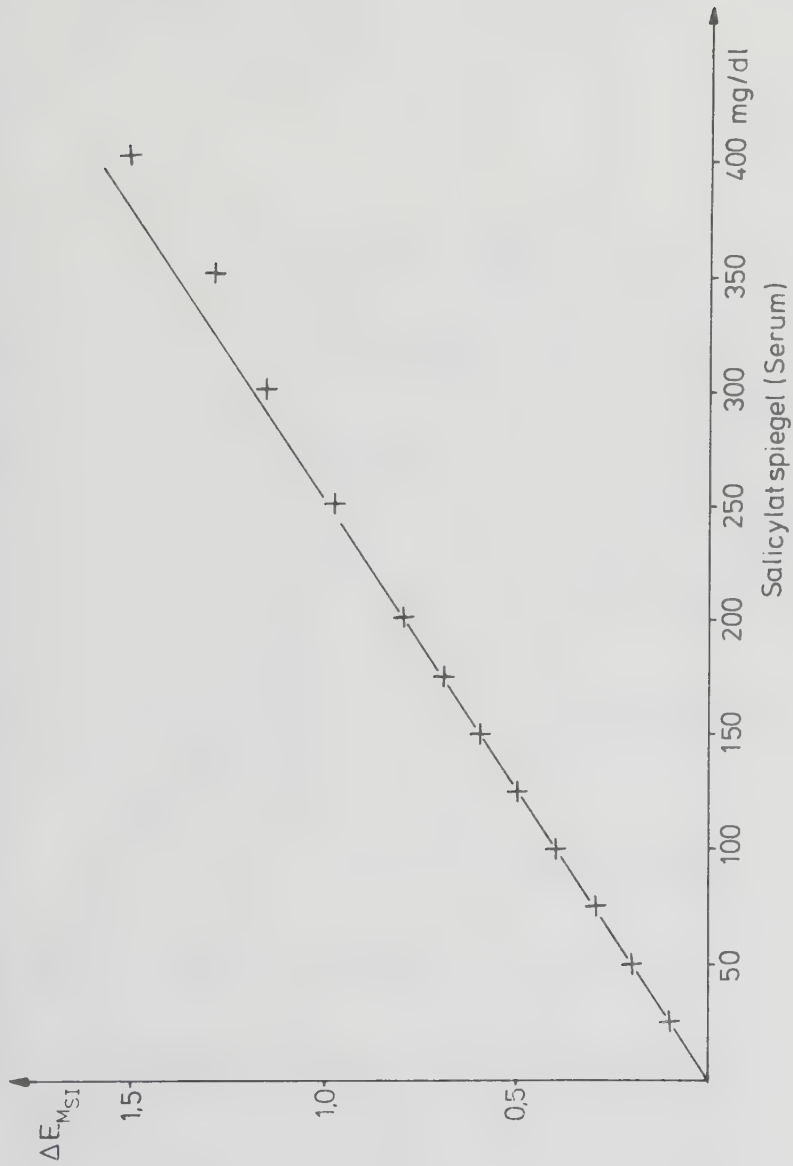
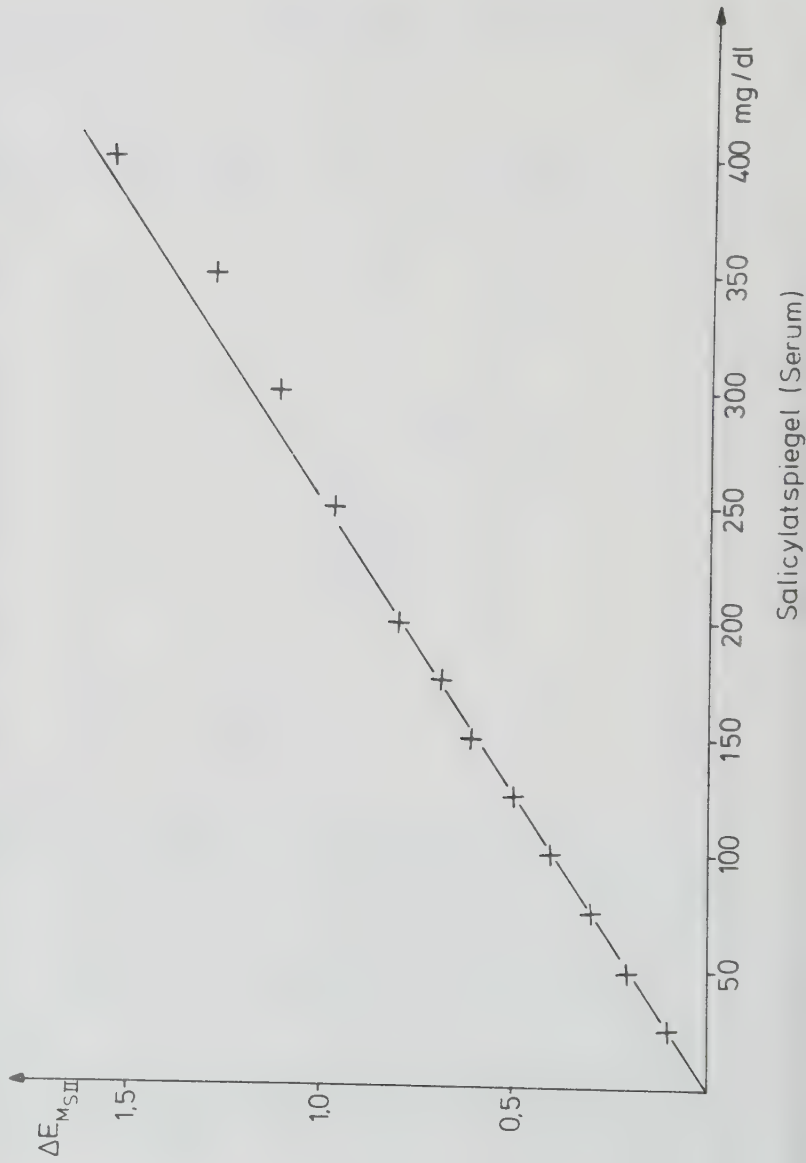


Abb. 11: Salicylateichkurve im Serum II nach der Methode von Pierce



Die Bestimmung von Salicylat im Serum nach der standardisierten Methode von Pierce soll im Folgenden mit der bisher meist üblichen Bestimmung nach Trinder verglichen werden.

5.3 Salicylateichkurve im Serum (Methode nach Trinder)

Zur Erstellung einer Salicylateichkurve im Serum nach *Trinder* (1954) wurde aus der 10 g/dl Salicylatstammlösung ein Serumstandard von 100 mg/dl gewonnen. Mit diesem wurden die unterschiedlichen Konzentrationen im Serum hergestellt. In Tab. 5 sind die Ergebnisse aufgeführt, wobei deutlich wird, daß die Methode nach Trinder vorwiegend im therapeutischen Dosisbereich ihre Anwendung finden sollte, da sich toxische Salicylatspiegel nur durch Erstellen von Verdünnungen und anschließender Umrechnung bestimmen lassen.

Der errechenbaren Konzentration liegt hierbei die als Standard mitgeführte und 12-fach bestimmte Konzentration von 10 mg/dl zugrunde und ergibt sich zu

$$x = \frac{\Delta E_u}{\Delta E \cdot 10 \text{ mg/dl}} \cdot 10 \text{ mg/dl.}$$

Als Faktor folgt dann: $\frac{10 \text{ mg/dl}}{0,23} = \underline{\underline{43,48.}}$

Die vereinfachte Formel lautet schließlich:

$$x = \Delta E_u \cdot \underline{\underline{43,48.}}$$

Tab. 5: Ergebnisse von Untersuchungen zur Salicylatbestimmung im Serum nach der Methode von Trinder

Konz. (mg/dl)	Serumstandard 100 mg/dl (ml)	Serum (ml)	ΔE_{MTI}	errechn. Konz. (mg/dl)	F%
10	1	9	0,23	10	0
20	2	8	0,464	20,17	0,85
30	3	7	0,675	29,35	2,16
40	4	6	0,882	38,35	4,12
50	5	5	1,11	48,26	3,48
60	6	4	1,33	57,83	3,62

Bei dieser Meßreihe kann die Präzision

bei 10 mg/dl mit:

$$M = 0,23$$

$$s = 0,003$$

$$Vk = 1,3 \%$$

und bei 40 mg/dl mit:

$$M = 0,882$$

$$s = 0,007$$

$$Vk = 0,8 \%$$

beschrieben werden.

Wiederum ist ein hochsignifikanter Korrelationskoeffizient (bis 60 mg/dl) mit $r = 1,0$ anzumerken.

Die Resultate sind in Abb. 12 nochmals graphisch zusammengefaßt und in Abb. 13 einer zu diagnostischen Zwecken im Erlanger Institut für Rechtsmedizin verwandten Salicylateichkurve im Serum nach Trinder vergleichend gegenübergestellt. Bei letzterer Eichkurve wurden wässrige Standards verwendet, was sich in einem geringen Steilheitsunterschied der beiden ansonsten sehr ähnlichen Geraden ausdrückt.

Abb. 12: Salicylateichkurve im Serum nach der Methode von Trinder (Serumstandard)

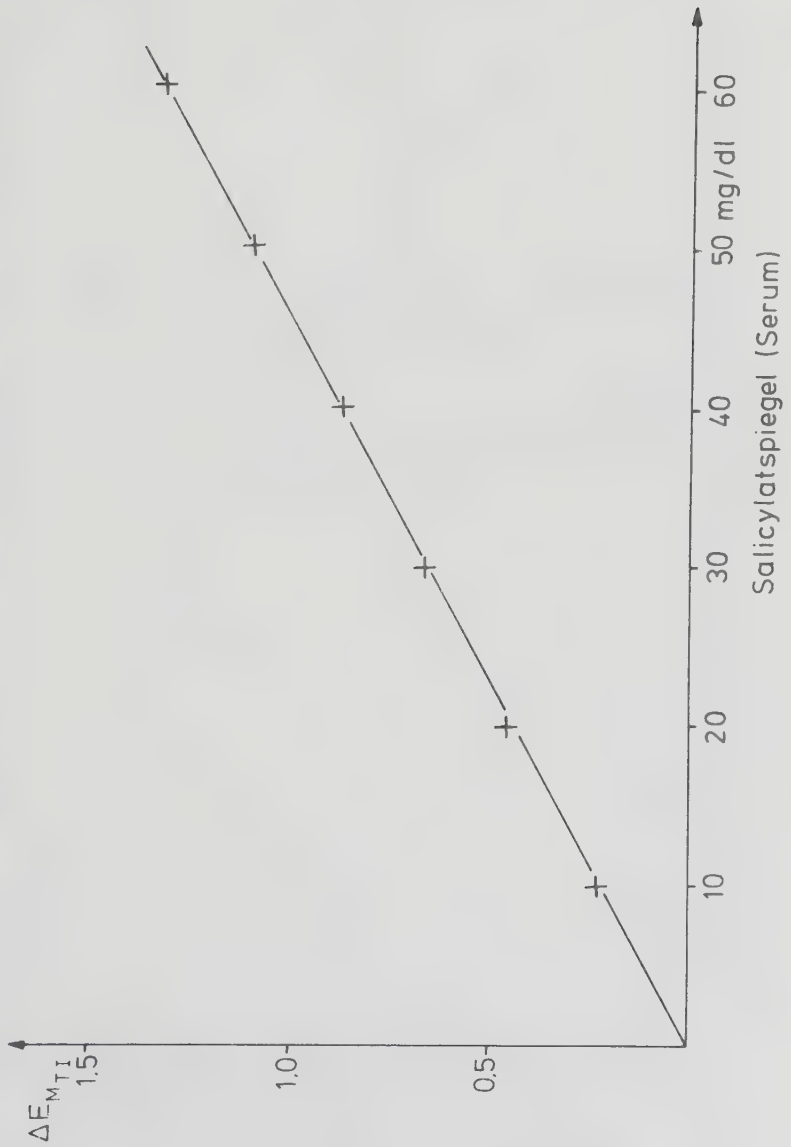
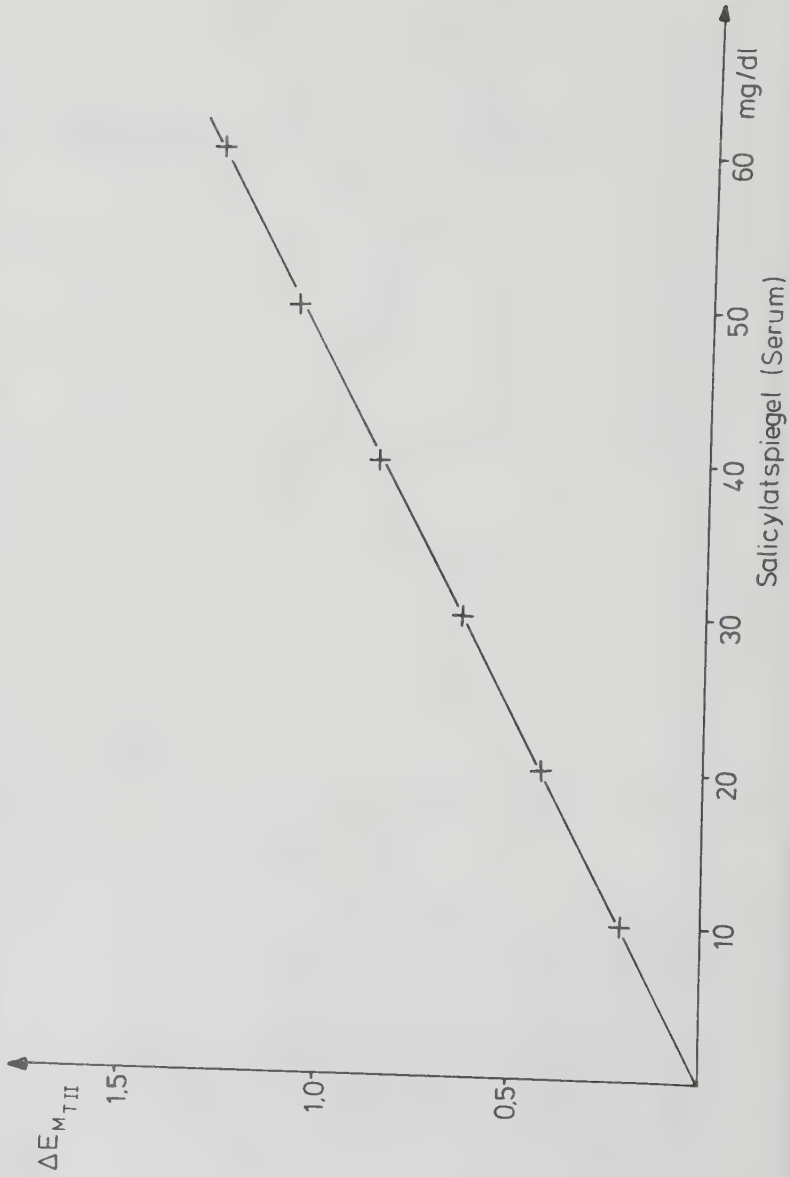


Abb. 13: Salicylateichkurve im Serum nach der Methode von Trinder (wässriger Standard - Institut für Rechtsmedizin, Erlangen -). $\Delta E_{M_{III}}$ dient der Abgrenzung zu eigenen Untersuchungen



5.4. Standardeichkurve (Methode nach Pierce)

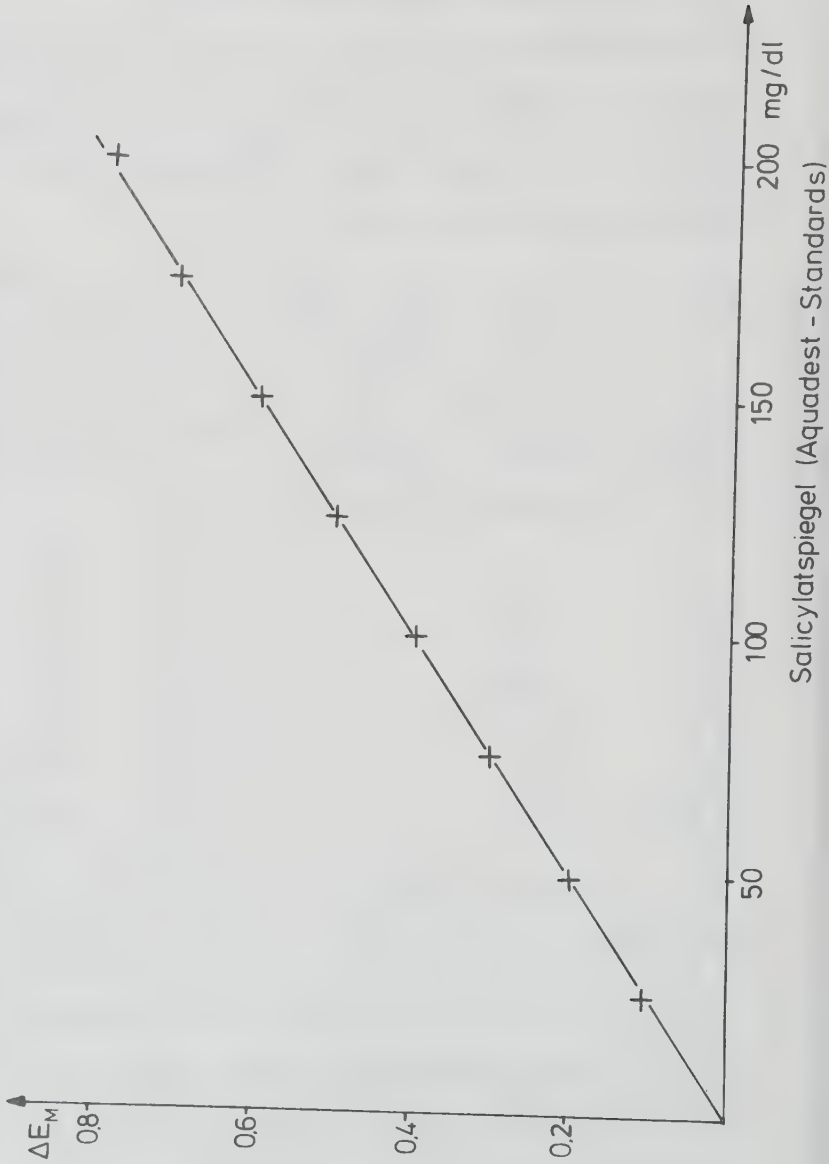
Um eine nochmalige Kontrolle der von Pierce mitgelieferten Standards zu ermöglichen, soll eine Eichkurve erstellt werden, die ausschließlich unter Verwendung dieser Standards hergestellt wird. Tab. 6 zeigt die Durchführung und die Ergebnisse dieser Untersuchung.

Tab. 6: Ergebnisse von Untersuchungen zur Salicylatbestimmung in wässrigem Milieu unter Verwendung der mitgelieferten Standards nach der Methode von Pierce

Konz. (mg/dl)	Standard (ml) 400 mg/dl	Tris (ml)	H ₂ O(ml)	ΔE_M	errechn.Konz. (mg/dl)	F%
25	mitgelieferter Standard 2 ml		0,1		25	0
50	0,25	1	0,75	0,202	50,5	1
75	0,375	1	0,625	0,303	75,75	1
100	0,5	1	0,5	0,396	99	1
125	0,625	1	0,375	0,502	125,5	0,4
150	0,75	1	0,25	0,598	149,5	0,33
175	0,875	1	0,125	0,705	176,25	0,71
200	1,0	1	----	0,786	196,5	1,75

Die Firma Pierce rät anhand dieser Lösungen, die für das jeweils benutzte Spektralphotometer maximale Wellenlänge zu ermitteln. Der Korrelationskoeffizient $r = 1,0$ zeigt hohe Signifikanz. Auf eine Präzisionskontrolle konnte angesichts der weitgehenden Übereinstimmung sowohl mit den unter 5.1 aufgeführten Salicylateichkurven in wässrigem Milieu als auch mit den unter 5.2 nachzuschlagenden Salicylateichkurven im Serum verzichtet werden. Abb. 14 verdeutlicht dies als Diagramm.

Abb. 14: Salicylateichkurve in wässrigem Milieu unter ausschließlicher Verwendung der mitgelieferten Standards nach der Methode von Pierce



5.5 Salicylateichkurve im Urin (Methode nach Pierce)

Obwohl die Gebrauchsanleitung für Pierce Salicylate Rapid Stat[®] Diagnostic Kit eine quantitative Salicylatanalyse im Urin nicht nennt, soll an dieser Stelle auch diese Problematik untersucht werden. Pierce weist jedoch auf einen möglichen qualitativen Nachweis von Salicylat im Urin mittels 0,2 ml Urin und 2 ml Farbreagens bei Entwicklung einer violetten Farbe hin, wobei aber die Spezifität dieser Farbreaktion nicht eindeutig ist (s.u.). Tab. 7 zeigt die Resultate der durchgeführten Meßreihe.

Tab. 7: Ergebnisse von Untersuchungen zur quantitativen Salicylatbestimmung im Urin nach der Methode von Pierce
(*kursiv* 5 g/dl Salicylatlösung)

Konz. (mg/dl)	Stammlsg. (ml)	Urin (ml)	ΔE_M	errechn. Konz. (mg/dl)
25	0,05	9,95	0,018	4,5
50	0,05	9,95	0,135	33,75
75	0,15	9,85	0,193	48,25
100	0,1	9,9	0,277	69,25
125	0,25	9,75	0,325	81,25
150	0,15	9,85	0,368	92
175	0,35	9,65	0,438	109,5
200	0,2	9,8	0,518	129,5
250	0,25	9,75	0,611	152,75
300	0,3	9,7	0,761	190,25
350	0,35	9,65	0,91	227,5
400	0,4	9,6	0,993	248,25

Der Urinleerwert - gemessen gegen Aqua dest. - betrug $\Delta E_M = 0,106$. Der Korrelationskoeffizient (25 mg/dl - 400 mg/dl) von $r = 0,99$ sowie die Abb. 15 zeigen, daß mit Hilfe des Farbreagens von Pierce durchaus eine Salicylateichkurve erstellt werden kann, eine Berechnung der Salicylatkonzentration aus ΔE_M über die von Pierce genannte Formel jedoch nicht im Rahmen der Möglichkeiten des Rapid Stat[®] Kits liegt. Dem wird - wie eingangs schon erwähnt - durch einen entsprechenden Hinweis in der Gebrauchsanleitung Rechnung getragen.

Die Präzision der Meßreihe bei 200 mg/dl Salicylat im Urin ist

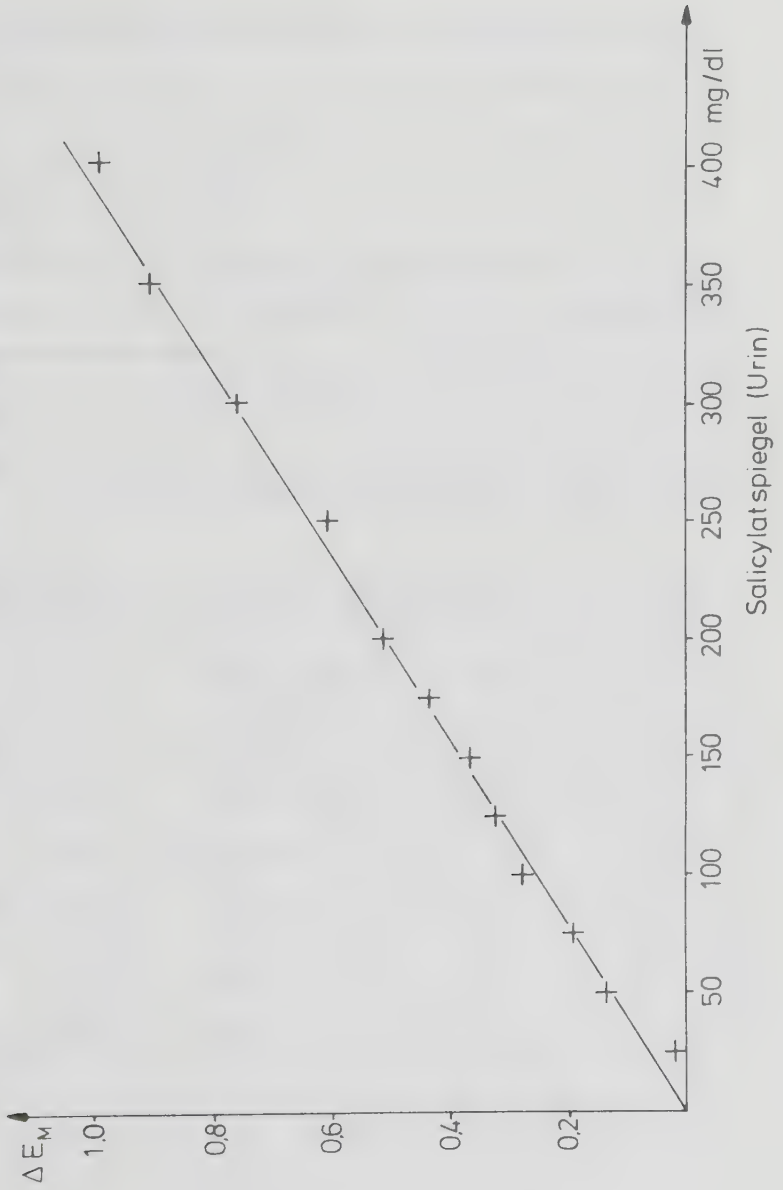
$$M = 0,518$$

$$s = 0,071$$

$$V_k = 3,28 \%$$

Auf die Schwierigkeiten, die mit der Gestaltung einer Eichkurve im Urin und deren diagnostischer Bedeutung in Verbindung mit der ständig schwankenden Konzentrierung des Urins durch die Niere im Zusammenhang stehen, wird im Kapitel IV dieser Abhandlung noch ausführlich einzugehen sein.

Abb. 15: Salicylateichkurve im Urin nach der Methode von Pierce



5.6 Salicylursäureeichkurve im Urin (Methode nach Pierce)

Da Salicylursäure neben Salicylsäure der Hauptmetabolit bzw. das Hauptausscheidungsprodukt der Salicylate ist (s.o), soll auch hierfür der Versuch unternommen werden, eine Eichkurve für Urin aufzustellen. Es sei noch einmal daraufhingewiesen, daß wegen des hohen Alkoholgehaltes der verwendeten Stammlösung (s.o.) - ein Salz der Salicylursäure stand uns nicht zur Verfügung - eine rasche Verarbeitung notwendig erscheint. Tab. 8 gibt die Resultate wieder.

Tab. 8: Ergebnisse zur quantitativen Salicylursäurebestimmung im Urin nach der Methode von Pierce

Konz. (mg/dl)	Stammlsg. (ml)	Urin (ml)	ΔE_M	errechn.Konz. (mg/dl)
25	0,125	4,875	0,026	6,5
50	0,25	4,75	0,061	15,25
100	0,5	4,5	0,117	29,25
125	0,625	4,375	0,133	33,25
150	0,75	4,25	0,171	42,75
200	1,0	4	0,174	43,5
300	1,5	3,5	0,265	66,25
400	2	3	0,359	89,75
600	3	2	0,585	146,25

Die Präzision beträgt bei 200 mg/dl Salicylursäure im
Urin

$$M = 0,174$$

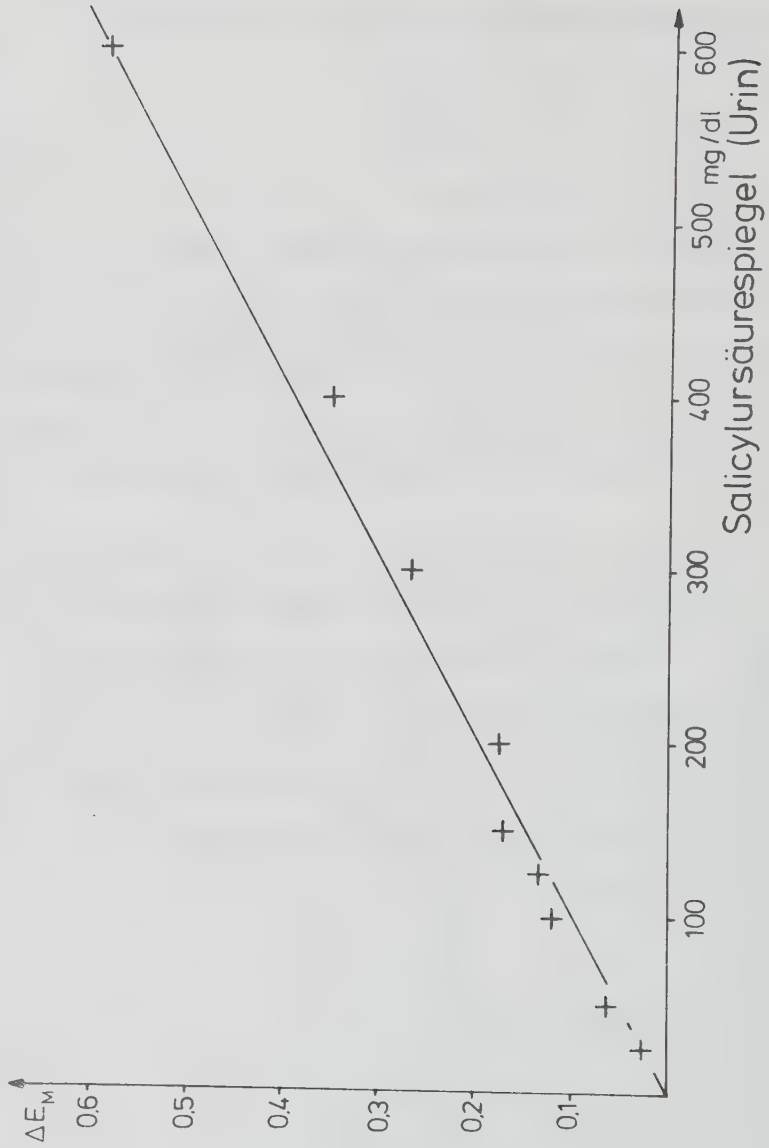
$$s = 0,004$$

$$V_k = 2,3 \, \%$$

Äbenso wie bei der Salicylatbestimmung im Urin zeigt sich auch hier, daß zwar eine Eichkurve aufgestellt werden kann, eine rechnerische Darstellung der Ausgangskonzentrationen über ΔE_M aber nicht möglich ist. Der Korrelationskoeffizient von $r = 0,92$ (25 mg/dl - 600 mg/dl), die errechneten Konzentrationen der Tab. 8 sowie Abb. 16 belegen dies deutlich.

Vergleicht man den Urinleerwert dieser Meßreihe von $\Delta E_M = 0,072$ mit dem der unter 5.5 aufgeführten Meßreihe von $\Delta E_M = 0,106$, so wird schon allein an diesen beiden Werten das unterschiedliche Konzentrierungsverhalten der Niere, und letztthin die unterschiedliche Intensität der Eigenfarbe des Urins offenkundig. Die damit in Verbindung stehende Problematik bezüglich des Nutzens von Eichkurven im Urin, wird, wie oben erwähnt, in Kapitel IV erörtert.

Abb. 16: Salicylursäureeichkurve im Urin nach der Methode von Pierce



5.7 Haltbarkeit des Ansatzes

Um die Haltbarkeit, sprich die Stabilität der bei all unseren vorangegangenen Versuchen entstandenen Farblösung zu überprüfen, wurde eine 100 mg/dl Serumsalicylatkonzentration nach den obenangegebenen Kriterien hergestellt, in einer dicht schließenden Küvette aufbewahrt und wiederholt gegen ein entsprechend vorbereitetes Normalserum gemessen.

Tab. 9: Zeit-Extinktionsverhalten einer 100 mg/dl Serumsalicylatlösung

Zeit (Std.)	$\Delta E_{100 \text{ mg/dl}}$
0	0,387
1	0,384
2	0,387
3	0,388
4	0,386
5	0,389
6	0,388
24	0,385

Aus Tab. 9 geht hervor, daß einem nach der Methode von Pierce verarbeiteten Ansatz eine Farbkonzanz von 24 Std. zugebilligt werden kann. In jedem Fall ist aber die in der Gebrauchsanleitung von Pierce nachzulesende Mindesthaltbarkeit von 4 Std. erfüllt.

5.8 Untere Nachweisgrenze

Da im klinischen Gebrauch des Pierce Rapid Stat[®] Diagnostic Kit in den seltensten Fällen ein Normalserum zur Verfügung stehen dürfte, sei an dieser Stelle die untere Nachweisgrenze (UNG) für Bestimmungen im Serum, gemessen gegen Aqua dest., das auch im Rapid Stat[®] als Leerwert dient, angegeben. Die untere Nachweisgrenze ist als

$$\text{Serumleerwert} + 3 s$$

definiert, wobei wiederum 12 Messungen erfolgten.

$$\Delta E_M = 0,053$$

$$s = 0,002$$

$$\text{UNG} = \underline{\underline{0,059}}$$

Im Urin läßt sich eine vergleichbare Bestimmung der unteren Nachweisgrenze von Salicylat oder Salicylursäure nicht durchführen, da die sehr unterschiedliche Farbintensität des Urins als Folge des wechselhaften Konzentrierungsverhaltens der Niere dies unmöglich macht. Hier sollte evtl. die Extinktion des jeweils zu untersuchenden Urins ohne Farbreagens gegen Aqua dest. allein bestimmt werden, um in etwa einen Anhalt für die Eigenfarbe des Urins zu bekommen.

5.9 Nachweis sehr hoher Konzentrationen von Salicylat bzw. Salicylursäure im Serum und im Urin

Da die Methode von Pierce nach Herstellerangaben nur bis 200 mg/dl Salicylat im Serum dem Beer'schen Gesetz gehorcht,

erfordert der Nachweis höherer Konzentrationen die Verdünnung der erhöhten Serumspiegel in der Bereich unterhalb von 200 mg/dl Salicylat im Serum, wobei die Ausgangskonzentration schließlich über den Verdünnungsfaktor rückgerechnet werden kann. Der Einfachheit halber wurde von uns die Gültigkeit des Beer'schen Gesetzes für die Salicylat- bzw. Salicylsäurebestimmung im Urin ebenfalls bis zur Grenze von jeweils 200 mg/dl angenommen. Bei der Methode nach Trinder hingegen erscheint der oben beschriebene Nachweis höherer Konzentrationen schon ab ungefähr 70 mg/dl Salicylat im Serum angebracht.

Die Ausgangsextinktionen der von uns erfaßten hohen Konzentrationen lagen in der Regel der Fälle über $\Delta E_M = 2,0$ und damit erheblich über den genannten Grenzkonzentrationen. Die Verdünnungen wurden mit physiologischer Kochsalzlösung vorgenommen. Die Ausgangskonzentrationen, die aus den obenangeführten Stammlösungen hergestellt und gegen Normalserum bzw. -urin gemessen wurden, sind entweder rein rechnerisch - Methode nach Pierce im Serum - oder wie im Urin bzw. bei der Methode nach Trinder über die betreffenden Eichkurven ermittelt worden. In Tab. 10 sind die Ergebnisse zusammengefaßt. Bei den angegebenen Ausgangskonzentrationen muß man sich allerdings darüber im Klaren sein, daß Werte von 600 bzw. 800 mg/dl Salicylat im Serum in der Praxis wohl kaum erreicht werden dürfen, da schon wesentlich niedrigere Serumspiegel zum Tode führen können (s.o.). Im Urin hingegen sind solche Konzentrationen nicht ausgeschlossen, da diese hier im Vergleich zum

Serum um den Faktor 1,5 bis 3 höher liegen.

Zu den Ergebnissen selbst läßt sich anmerken, daß eine Verdünnung und anschließende Rückrechnung sehr hoher Salicylatkonzentrationen im Serum sowohl nach der Methode von Pierce als auch nach der von Trinder noch gerechtfertigt erscheint, wenn auch im Durchschnitt 10% niedrigere Werte erhalten werden, wohingegen dieses Vorgehen bei sehr hohen Salicylat- bzw. Salicylursäurekonzentrationen im Urin angesichts eines prozentualen Fehlers von etwa 30%, wobei zu hohe Konzentrationen ermitteln werden, nicht sonderlich sinnvoll erscheint.

Tab. 10: Ermittlung sehr hoher Konzentrationen von Salicylat im Serum - Methode nach Pierce (P) bzw. Trinder (T) - und Salicylat (S) bzw. Salicylursäure (SU) im Urin - Methode nach Pierce (P) -

Medium u. Methode	Ausgangskonz. (mg/dl)	Verdünnungsverhältnis	ΔE_M	ermittelte Konz. (mg/dl)	F%
Serum (P)	600 (S)	1 : 4	0,545	545	9,16
Serum (P)	800 (S)	1 : 4	0,693	693	13,37
Serum (T)	200 (S)	1 : 4	1,028	180	10
Serum (T)	600 (S)	1 : 10	1,211	545	9,16
Urin (P)	600 (S)	1 : 4	0,533	820	36,66
Urin (P)	800 (S)	1 : 4	0,67	1046	30,75
Urin (P)	400 (SU)	1 : 4	0,13	529	32,25
Urin (P)	600 (SU)	1 : 4	0,184	747	24,5

5.10 Interferierende Substanzen

Mit der Methode nach Pierce interferieren nach Herstellerangaben (siehe Gebrauchsanleitung im Anhang dieser Arbeit) Homogentisinsäure, Acetessigsäure, Natriumacid, die störende Konzentrationen, sprich ähnliche Farbentwicklungen wie Salicylate, vorwiegend im Urin erreichen und daher auch nur im Urin getestet wurden, und Antikoagulantien wie EDTA.

Um letzteren Fall auszuschließen, ist die Verwendung von Serum anstelle von Plasma angebracht.

Lösungen der drei anderen genannten Substanzen von 10 µg/ml, 100 µg/ml, 1 mg/ml und 10 mg/ml im Urin wurden untersucht.

Homogentisinsäure, die bei Alkaptonurie (Häufigkeit/Lebendgeborene = 1:10⁶) im Urin gefunden wird, ergibt im Bereich zwischen 0,1 - 1 mg/ml erste meßbare Veränderungen, jedoch selbst bei 10 mg/ml Urin ist die laut Gebrauchsanweisung den Salicylaten ähnliche Farbentwicklung im Verfahren nach Pierce nicht direkt sichtbar. Verdächtig auf eine Alkaptonurie ist Urin, der an der Luft langsam dunkel wird. Durch Zusatz von geringen Mengen einer Base - von uns wurde NaOH verwendet - läßt sich Homogentisinsäure im Urin an der schnellen Entstehung einer braunschwarzen Farbe nachweisen.

Acetessigsäure, die bei der diabetischen Ketoacidose vermehrt im Urin ausgeschieden wird, zeigt bei der Methode nach Pierce ebenfalls zwischen 0,1 - 1 mg/ml Urin erste spektral-photometrisch feststellbare Veränderungen, die sich um 1 mg/dl

auch in einer den Salicylaten ähnlichen violetten Farbe sichtbar ausdrücken. Durch Erhitzen auf 100°C ist diese Farbentwicklung jedoch reversibel, womit das Vorhandensein von Acetessigsäure verifizierbar ist.

Natriumacid schließlich wird als Konservierungsmittel in Urinbehältern verwendet. Meßbare Abweichungen finden sich auch hier ab $0,1 - 1 \text{ mg/ml}$ Urin, wohingegen erst ab etwa 10 mg/dl eine braune Farbe zum Vorschein kommt. Urinbehälter mit Natriumacidzusatz sind deshalb zu meiden.

IV. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war die Überprüfung des Pierce Rapid Stat® Diagnostic Kit als geeignetes Reagensverfahren zur quantitativen photometrischen Bestimmung von Salicylat im Serum, aber auch im Urin. Untersuchungen in wässrigem Milieu, im Serum - im Vergleich zur Methode nach Trinder - und im Urin wurden durchgeführt. Im Urin wurde desgleichen die Nachweismöglichkeit von Salicylursäure - einem Metaboliten der Salicylsäure - getestet.

Die Methode von Pierce ist in allen drei Milieus leicht handhabbar und hinreichend präzise, wobei sich allerdings die Bestimmung des Extinktionsmaximums für das jeweils benutzte Spektralphotometer empfiehlt. Da der Rapid Stat® Kit nach unseren Ergebnissen dem Beer'schen Gesetz bis mindestens 300 mg/dl Salicylat bzw. Salicylursäure im Serum bzw. im Urin Genüge leistet - die Gebrauchsanweisung gibt diesen Zusammenhang nur bis 200 mg/dl und nur für Serum an - eignet er sich als einfacher klinisch-chemischer Suchtest vor allem für die Untersuchungen bei Salicylatvergiftungen. Demgegenüber eignet sich die Trinder-Methode besser zur Bestimmung therapeutischer Wirkspiegel von Salicylat im Serum (≤ 60 mg/dl), während hohe Salicylatspiegel, wie sie bei Vergiftungen erreicht werden, nur über einen zu ermittelnden Verdünnungsfaktor rückrechenbar sind. Außerdem ist die Handhabung der Trinder-Methode - abgesehen von den selbst herzustellenden Lösungen - schwieriger, da sich bei der Eiweißfällung im Gegensatz zur Methode nach

Pierce, bei der sich das Protein am Boden des Reagenzglas absetzt, die Reagenzglaswand belegt, wodurch es beim Abpipettieren des Überstandes zu Verunreinigungen kommen kann. Weiterhin enthält das Trinder-Reagens Quecksilber, was bei unvorsichtigem Arbeiten ein Gesundheitsrisiko birgt. Das Pierce-Reagens enthält hingegen kein Quecksilber.

Die Bestimmung hoher Konzentrationen von Salicylat im Serum durch Rückrechnung über den ermittelten Verdünnungsfaktor entspricht sich bei beiden Methoden mit um ungefähr 10% zu niedrig bestimmten Werten, während die Anwendungshäufigkeit dieses Verfahrens bei der Trinder-Methode im Vergiftungsbereich von Salicylaten wesentlich höher sein dürfte als die der Methode nach Pierce, weshalb letzterer Suchtest im Durchschnitt genauere Ergebnisse zu erzielen vermag.

Ferner bietet die standardisierte Methode nach Pierce den Vorteil, mittels des mitgelieferten 25 mg/dl Standards die Serumsalicylatkonzentrationen zu berechnen, d.h. sie müssen nicht anhand einer vorher erstellten Eichkurve abgelesen werden. Dieser Vorteil kann bei der Trinder-Methode durch Mitführen eines mehrfach bestimmten selbst hergestellten Standards - wie von uns gezeigt - ausgeglichen werden.

Die Methode nach Pierce kann auch zur Salicylat- bzw. Salicylsäurebestimmung im Urin herangezogen werden, wobei auf Interferenzen mit Homogentisinsäure, Acetessigsäure und Natriumacid zu achten ist. Eine Berechnung der Konzentrationen kommt hierbei aber nicht in Betracht, vielmehr müssen Eichkur-

ven für Salicylat und Salicylursäure angefertigt werden, und die den Extinktionen entsprechenden Konzentrationen dort abgelesen werden. Allgemein stößt die photometrische Ermittlung von Substanzen im Urin auf die Schwierigkeit, daß das Konzentrierungsverhalten der Niere und mithin die Farbsintensität des Urins (s.o.) sehr unterschiedlich sind, und ein vergleichbarer Normalurin wohl nur in den seltensten Fällen zur Verfügung stehen dürfte. Aus eben diesen Gründen ist die Angabe einer unteren Nachweisgrenze für Salicylate, wie sie für Serum mit $\Delta E_M = 0,059$ von uns ermittelt wurde, nicht möglich. In jedem Fall sollte die Extinktion des Urins gegen Aqua dest. ohne weitere Zusätze gemessen werden und mit in die Überlegungen zur Ermittlung der jeweiligen Konzentrationen im Urin Eingang finden. Dabei wird es sinnvoll sein als Leerwert nur den gegen Aqua dest. gemessenen, zu untersuchenden Urin zu nehmen, da die Eigenextinktion des Ansatzes nach Pierce mit Aqua dest. gemessen gegen Aqua dest. allein mit $\Delta E_M = 0,004$ als sehr niedrig einzustufen ist.

Der Versuch der Bestimmung eines Verdünnungsfaktors im Urin bei sehr hohen Salicylatkonzentrationen erscheint wenig sinnvoll, da im Durchschnitt 30% zu hohe Werte auftreten.

Abschließend läßt sich festhalten, daß der Pierce Rapid Stat[®] Diagnostic Kit eine schnelle und einfache Methode zur Bestimmung von Salicylaten im Serum und mit Einschränkung auch im Urin darstellt, wenn er auch keine Neuerung auf dem Gebiet der Differenzierung von freiem und gebundenem Salicylat im Serum erlaubt, die im Hinblick auf den wohl ausschließlich therapeu-

tische bzw. toxische Effekte hervorrufenden freien Salicylat-
anteil wünschenswert wäre.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Ein standardisiertes Reagensverfahren zur quantitativen photometrischen Bestimmung von Salicylat im Serum wurde vorgestellt.

Hierbei zeigte sich, daß der zu untersuchende Kit der Firma Pierce rein rechnerische Bestimmungen von Salicylat im Serum bis 300 mg/dl zuläßt - die Arbeitsanleitung gibt 200 mg/dl als Grenzwert an -, wobei eine untere Nachweisgrenze von $\Delta E_M = 0,059$ entsprechend 14,75 mg Salicylat / dl Serum zu beachten ist.

Ferner wurde versucht, ähnliche Zusammenhänge für Salicylat und Salicylursäure im Urin aufzuzeigen. Es ergab sich die Möglichkeit, Eichkurven der genannten Stoffe im Urin zu erstellen, anhand derer unbekannte zu bestimmende Konzentrationen von Salicylat und Salicylursäure im Urin abgelesen werden konnten.

Auf das stark schwankende Konzentrierungsverhalten der Niere mit der Folge eines sehr unterschiedlichen Leerwertes und mithin einer von Fall zu Fall differierenden unteren Nachweisgrenze wurde hingewiesen. Ebenso wurde der störende Einfluß von EDTA bei der Verwendung von Plasma, sowie von Homogentisinsäure, Acetessigsäure und Natriumacid im Urin verdeutlicht.

Schließlich ergab der Vergleich der standardisierten Methode nach Pierce mit der Methode nach Trinder eine höhere Genauig-

keit der Methode nach Pierce oberhalb einer Konzentration von 60 mg/dl, womit eine Anwendung dieser Methode im Konzentrationsbereich von Vergiftungen berechtigt erscheint. Hingegen dürfte die Methode nach Trinder im therapeutischen Bereich von Salicylaten zur Dosisbestimmung vorzuziehen sein.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. *Austen, K.:*

Immunological aspects of salicylate action - a review,
in: Dixon, A., Martin, B., Smith, M., Wood, P.
Salicylates: An International Symposium,
J & A Churchill, London, 1963.

2. *Batterman, R.:*

A critical review of the effects of salicylates on
pituitary-adrenal function,
Postgrad. Med. 25, 152 (1959).

3. *Berg, K.J.:*

Acetylsalicylsyreforgiftning. Metaboliske effekter,
klinikk og behandling,
T.norske Laegeforen 98, 1259 (1978).

4. *Beyer, K.-H.:*

Biotransformation der Arzneimittel,
Deutscher Apotheker-Verlag, Stuttgart, 1977.

5. *Bhargava, K., Chandra, O., Verma, D.:*

The mechanism of the emetic action of sodium salicylate,
Br. J. Pharmacol. Chemother. 21, 45 (1963).

6. *Biesterfeld, R.C., Shaw, D.H., Taintor, J.F.:*
Aspirin: an update,
J. Endod. 4, 198 (1978).
7. *Bollet, A.:*
Inhibition of glucosamine-6-PO₄ synthesis by salicylate
and other antiinflammatory agents in vitro,
Arthritis Rheum. 4, 624 (1961).
8. *Bourne, H.R., Lichtenstein, L.M., Henney, C.S., Melmon,
K.L., Weinstein, Y., Shearer, G.M.:*
Modulation of inflammation and immunity by cyclic AMP,
Science 184, 19 (1974).
9. *Bove, K.E., Bhathena, D., Wyatt, R.J., Lucas, B.A.,
Holland, N.H.:*
Diffuse metanephric adenoma after in utero Aspirin
intoxication,
Arch. Path. Lab. Med. 103, 1987 (1979).
10. *O'Brien, J.:*
Effects of salicylates on human platelets,
Lancet 1, 779 (1968).
11. *Buchner, A.:*
Vorläufige chemische Untersuchungen der Weidenrinde,
Repertorium für die Pharmazie 29, 417 (1828).

12. *Clarke, C.A.:*

Pharmakogenetics. A study of inherited variability in the response to drugs,

J. Pharm. Pharmacol., Suppl. 14, 20 (1962).

13. *Cohen, L.S.:*

Clinical pharmacology of acetylsalicylic acid,

Seminars in Thrombosis and Hemostasis 2, 3 (1976).

14. *Davison, C., Smith, P.K.:*

The binding of salicylic acid and related substances to purified proteins,

J. Pharmacol. ex. Ther. 133, 161 (1961).

15. *Done, A.K.:*

Salicylate intoxication. Significance of measurement of salicylate in blood in cases of acute ingestion, Pediatrics 26, 800 (1960).

16. *Elliot, H.E.:*

Reduced adrenocortical excretion rates in man following aspirin administration,

Metabolism 11, 1015 (1962)

17. *Ferreira, S.H.:*

Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia,

Nature 240, 200 (1972).

18. *Furst, D.E., Gupta, N., Paulus, H.E.:*
Salicylate metabolism in twins,
J. Clin-Invest. 60, 32 (1977).
19. *Geldmacher-v.Mallinckrodt, M.:*
Einfache Untersuchungen auf Gifte im klinisch-chemi-
schen Laboratorium,
Thieme, Stuttgart, 1976.
20. *Gerhardt, W.:*
Über die Zusammensetzung des Salicins sowie über die
Beziehungen zwischen der Salicyl-, Phenyl- und Indigreihe,
Ann. Chem. Pharm. 45, 19 (1843).
21. *Goodman, L., Gilman, A.:*
The pharmacologic basis of therapeutics,
Macmillan, New York, 1980.
22. *Hetzel, P., Hine, D.:*
The effects of salicylates on the pituitary and
suprarenal glands,
Lancet 2, 94 (1951).
23. *Hoffmann, F., in: Schmidt, A.:*
Die industrielle Chemie in ihrer Bedeutung im Weltbild,
de Gruyter & Co., Berlin-Leipzig, 1934.

24. *Hollander, J., McCarty, D.:*
Arthritis and allied conditions,
Lea & Febiger, Philadelphia, 1972.
25. *Kolbe, H.:*
Über Synthese der Salicylsäure,
Ann. Chem. Pharm. 113, 125 (1860).
26. *Lawson, A.A.H. u. Mitarbeiter:*
Forced diuresis in the treatment of acute salicylate
poisoning in adults,
Quart. J. Medicine 38, 31 (1969).
27. *Levy, G.:*
Pharmacokinetics of aspirin in man,
J. Invest. Dermatol. 67, 667 (1976).
28. *Levy, G.:*
Clinical pharmacokinetics of aspirin,
Pediatrics 62, 867 (1978).
29. *Levy, G., Leonards, J.:*
Absorption, metabolism and excretion of salicylates,
in: Smith, M., Smith, P.:
The salicylates: A critical bibliographic review,
Wiley, New York, 1966.

30. *Levy, M.:*
Aspirin use in patients with major upper gastro-
intestinal bleeding and peptic-ulcer disease,
N. Engl. J. Med. 290, 1158 (1974).
31. *Lewis, G.P.:*
Neue Kenntnisse über Arachidonsäuremetaboliten,
Med. Welt 32, 920 (1981).
32. *Löwig, A.:*
Untersuchungen über das flüchtige Oel der Spirea ulmaria,
Ann. Physik Chemie 36, 383 (1835).
33. *Mathews, M., Dorfman, A.:*
Inhibition of hyaluronidase,
Physiol. Rev. 35, 381 (1955).
34. *Meyersohn, M., Perrier, D., Picchioni, A.L.:*
Evaluation of charcoal-sorbitol mixture as an antidote
for oral Aspirin® overdose,
Clin. Toxicol. 11, 561 (1977).
35. *Mizushima, Y., Kobayashi, M.:*
Interaction of anti-inflammatory drugs with serum pro-
teins, especially with some biologically active proteins,
J. Pharm. Pharmacol. 20, 169 (1968).

36. *Möhlenbruch, B.:*
Die in vitro Hydrolyse der Acetylsalicylsäure in
menschlichen Organen und Geweben,
Dissertation, Bonn, 1975.
37. *Petrin, A., Schmidt, R.:*
Über Nebenwirkungen der Acetylsalicylsäure,
Schweiz. Rundschau Med. (Praxis) 62, 1224 (1973).
38. *Prescott, L.F.:*
Analgetics,
Practitioner 200, 84 (1968).
39. *Rowland, M., Riegelman, S.:*
Pharmakokinetics of acetylsalicylic acid and salicylic
acid after intravenous administration in man,
J. Pharm. Sci. 57, 1313 (1968).
40. *Savege, T.M., Ward, J.D., Simpson, B.R., Cohen, R.D.:*
Treatment of severe salicylate poisoning by forced
alkaline diuresis,
Brit. med. J. 1969/I, 35 (1969).
41. *Saxl, O.:*
Nebenwirkungen von Salicylaten,
Fortschr. Med. 89, 1159 (1971).

42. *Schönhöfer, P.S.:*
Wirkungsweise der Antirheumatika aus der Sicht des
klinischen Pharmakologen,
Therapiewoche 31, 2099 (1981).
43. *Skidmore, J., Whitehouse, M.:*
Biochemical properties of anti-inflammatory drugs.
The inhibition of serotonin formation in vitro and
inhibition of esterase activity of alpha-chymotrypsin,
Biochem. Pharmacol. 16, 737 (1967).
44. *Sloane, D., Heinonen, O.P., Kaufman, D.W. et al.:*
Aspirin and congenital malformations,
Lancet 1, 1373 (1976).
45. *Smith, P.K.:*
The pharmacology of salicylates and related compounds,
Ann. N.Y. Acad. Sci 86, 38 (1960).
46. *Soyka, P.A., Soyka, L.F.:*
Absorption of salicylic acid,
J. Am. Med. Assoc. 244, 660 (1980).
47. *Stone, E. in: Hangarter, W.:*
Die Salicylsäure und ihre Abkömmlinge,
Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, 1974.

48. *Szczeklik, A., Gryglewski, R.J., Cerniawska-Mysik, G.:*
Participation of prostaglandins in the pathogenesis
of aspirin-sensitive asthma,
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 297, 99 (1977).
49. *Trinder, P.:*
Rapid determination of salicylate in biological fluids,
Biochem. J. 57, 301 (1954)
50. *Tschetter, P.M.:*
Salicylism,
Am. J. Dis. Child. 106, 134 (1963).
51. *Valman, H.B., Parry, O.J., Goghil, N.F.:*
Lesions associated with gastroduodenal haemorrhage, in
relation to aspirin intake,
Brit. med. J. 4, 661 (1968).
52. *Vane, J.R.:*
Inhibition of prostaglandine synthesis as a mechanism
of action for aspirin-like drugs,
Nature 231, 232 (1971).
53. *Wagner, H.:*
Pharmazeutische Biologie, Band 2,
Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart, 1980.

54. *de Weck, A.L.:*
Acetylsalicylsäure: ein altes Arzneimittel in
neuerem Blickwinkel,
Dtsch. Med. Wochenschrift 96, 1109 (1971).
55. *Wijnja, L., Snijder, J.A.M., Nieweg, H.O.:*
Acetylsalicylic acid as a cause of pancytopenia from
bonemarrow damage,
Lancet 11, 768 (1966).
56. *Wilson, D.E.:*
Prostaglandins: Their action on the gastro-intestinal
tract,
Arch. int. Med. 133, 112 (1974).
57. *Wolff, J.:*
Salicylate and thyroid function,
J. Clin.-Invest. 37, 1144 (1958).
58. *Wosilait, W.D.:*
Theoretical analysis of the binding of salicylate by
human serum albumin: the relationship between free and
bound drug and therapeutic levels,
Europ. J. clin. Pharmacol. 9, 285 (1976).

INSTRUCTIONS—READ CAREFULLY

Product No. 47900

PIERCE

Salicylate

Rapid Stat® Kit

Single reagent procedure for
the quantitative colorimetric
determination of SALICYLATE
in serum

PIERCE Box 117, Rockford, Illinois 61105

©1974 Pierce Chemical Co., All Rights Reserved

PRODUCT DESCRIPTION AND USE

The Salicylate Rapid Stat® Kit is a set which includes a reagent and standards for performing the quantitative determination of salicylate in serum. The kit consists of: **Color Reagent** and **two aqueous salicylate standards** for direct use or in preparing a calibration curve.

INTRODUCTION AND CLINICAL SIGNIFICANCE

The methods for analyzing salicylate in serum and other body fluids have traditionally been:

The Folin-Ciocalteu reagent which gives the formation of a blue-colored complex with salicylates in strong alkaline solution and the well-known Trinder method in which a complex is formed in the presence of ferric ion in weakly acidic solution.

The Pierce Rapid Stat Kit is a modification of the Trinder method. The Kit contains a single acidic reagent containing ferric ion and colloidal hydrated tungsten trioxide sol. Since the reagent does not contain mercury, it is low in toxicity and presents little environmental pollution hazard. The tungsten trioxide sol precipitates the protein and simultaneously removes lipids, hemoglobin, bilirubin and carotene. The ferric ion reacts with salicylate ion to form a complex. After centrifuging to remove the precipitated protein, the absorbance of the supernatant is read at 540 nm. The procedure features quantitative results and small sample size. The test color is stable for a minimum of 4 hours and Beer's law is followed in the range of 0 to 200 mg salicylate/dl. It should be noted that the reagent is somewhat corrosive since it contains dilute sulfuric acid. Also, acetoacetic acid, which could appear in serum in severe cases of diabetes, will react with the reagent to produce a slight color. The ferric chloride in the reagent will also react with any enolizable compounds in which the enolic structure is present to the extent of at least 5 per cent¹.

CLINICAL SIGNIFICANCE

Aspirin is responsible for more cases of accidental poisoning in children than any other substance. Because aspirin is used so widely and is readily available, children frequently can obtain and swallow toxic quantities of salicylates. In attempted suicides, individuals often ingest very large amounts of salicylate. Accidental poisoning can also occur easily in adult or geriatric patients who are taking several medications containing salicylates concurrently (many non-prescription drugs contain salicylate) or in patients with chronic conditions requiring continuous aspirin therapy.

Salicylates are readily absorbed from all parts of the gastrointestinal tract and also through the skin; they migrate to all parts of the body. Therefore the plasma salicylate level only gives an approximate indication of how much salicylate is actually present.

Symptoms of poisoning are rapid in onset. Initial toxic doses of salicylate result in central nervous system (CNS) stimulation which may be manifested by hyperventilation, flushing and fever. If the salicylate poisoning is not recognized and thought to be a case of infection², the patient's condition can be made more critical if additional aspirin is given. CNS stimulation is then followed by depression. Toxic salicylate levels tend to damage the kidneys.

Since salicylate is an anion, its presence in the bloodstream in a concentration sufficient to cause clinical problems may cause an apparent electrolyte imbalance. An example of this has been given by Weisberg³. He uses the equations:

$$A = [\text{HCO}_3^-] + [\text{Cl}^-] + 24 \text{ mEq./L.}$$

$$C = [\text{Na}^+] + [\text{K}^+] + 7 \text{ mEq./L.}$$

In these equations all quantities are expressed in mEq./L. Quantities in brackets are concentrations:

A = Total anion concentration

C = Total cation concentration

Normally, after allowing for the possibility of various expected errors in the determination of the concentrations, it would be expected that A and C would come within 5 mEq./L. of one another. In severe salicylate poisoning it is found that C is significantly greater than A. Thus, if a comatose patient enters the emergency room and it is found that C is significantly greater than A, the possibility of aspirin or salicylate poisoning is to be considered. Because of the simplicity of this salicylate procedure the assumption of salicylate poisoning may be verified within minutes, especially since severe poisoning produces a very strong and easily seen violet color with the color reagent.

Urine salicylate concentration is about 1.5 to 3 times the corresponding serum concentration. A qualitative salicylate determination may be performed rapidly with a few drops of urine, this technique being especially convenient in suspected salicylate poisoning cases.

Traditional treatment for salicylate poisoning has been gastric lavage. However, due to the rapid absorption of salicylate, toxic quantities may have entered a patient's body through the duodenum. Therefore, a preferable course of action would be gastric lavage followed by frequent monitoring of the patient's blood serum for salicylate and the patient treated accordingly.

It might be useful in treating a patient to know how much salicylate was originally ingested. One indicator of this is the S_0 value. This is a theoretical concentration if the maximum amount of salicylate which can be absorbed for a particular dosage taken were instantaneously translated into a serum concentration. The formula for calculating S_0 is given as:

$$\log S_0 = \log S_a + k t_a$$

Where. S_0 = theoretical salicylate concentration
 S_a = salicylate concentration at time of analysis
 k = constant, with a usual value of 0.015
 (determined by A.K. Done⁴)
 t_a = time in hours between salicylate ingestion
 and salicylate analysis

A.K. Done has found that $k = 0.015$ when t is expressed in hours, corresponding to a half-life of about 20 hours. This means that with good kidney function the serum or plasma salicylate concentration will fall about 50% in 20 hours. With impaired kidney function the fall in concentration will be less than 50% in 20 hours as k is then decreased. The first-order rate constant k may be greatly increased by use of dialysis techniques. S_0 may be estimated by substituting the values of S and t in the equation along with the value 0.015 for k . It is necessary to know the time of ingestion of the salicylate. A more reliable value of S_0 may be obtained by finding serum or plasma salicylate concentration at two intervals, preferably more than 5 hours apart. These are placed on linear or semilogarithmic paper. A line drawn between the two data points will intersect the ordinate ($t = 0$) at $S = S_0$.

The reason for determining S_0 is that it appears to be a more reliable index of the degree of clinical severity of salicylate intoxication than is a random blood serum or plasma salicylate concentration. Random blood plasma or serum salicylate concentrations do not correlate well with the clinical severity. At times patients with seemingly moderate salicylate levels of 20 to 45 mg/dl have died, whereas other patients with much higher concentrations have had complete recovery. It appears that S_0 , rather than S , along with clinical judgment based upon the physician's examination of the patient, may be used to determine the degree of clinical toxicity in salicylate poisoning.

It has been suggested that S_0 may be used as a guide to treatment. S_0 values below 50 mg/dl may indicate absence of serious toxicity and require minimal treatment. S_0 values above 50 mg/dl indicate the need for more vigorous treatment. Individual factors, based on the physician's clinical judgment, will also enter into the choice of treatment. Tables I and II give values for S and S_0 as usually related to severity of salicylate intoxication.

Table I. Approximate Interpretation of Salicylate Concentration (S) and Clinical Severity of Toxicity⁵

Salicylate Concentration (S) mg/dl	Condition
under 45	Generally normal
45 to 65	Mild intoxication
65 to 90	Moderate intoxication
90 to 120	Severe intoxication
over 120	Usually fatal

Table II. Approximate Interpretation of Extrapolated Salicylate Concentration (S_0) and Clinical Severity of Toxicity (4).

Extrapolated Salicylate Concentration (S_0) mg/dl	Condition
under 50	Generally normal
50 to 80	Mild intoxication
80 to 100	Moderate intoxication
100	Severe intoxication
over 100	Usually fatal

It is best to use both Tables I and II when interpreting salicylate data as well as to allow for individual variants.

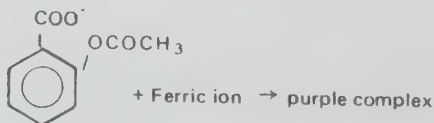
There seems to be no general agreement on toxicity levels by various authors. Tietz² reports toxicity levels as follows:

Salicylate Concentration mg/dl	Condition
under 2	no recent salicylate ingestion
2 to 30	therapeutic range
30 to 60	toxic range
over 60	can be fatal

Due to the differences in toxicity levels given by various authors, interpretation of the laboratory findings is best left in the hands of the patient's physician.

PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

The protein is precipitated out with tungsten trioxide sol which also removes lipids, carotene, bilirubin and hemoglobin. After centrifugation, the purple-colored supernatant is read at 540 nm.



The salicylate ion combines with ferric ion to form a purple-colored complex ion.

REAGENT CONTENTS

The Salicylate Rapid Stat Kit contains sufficient reagents and standards for performing 75 determinations as follows:

- | | |
|---|--|
| 1. Color Reagent | Active Ingredients (w/v): Sulfuric acid, 0.44%; Ferric Chloride Hexahydrate, 0.50%; Sodium Tungstate Dihydrate, 0.60%; also contains a surfactant and a stabilizer. |
| 2. Salicylate Standard
25 mg/dl | Active Ingredients (w/v): 29.0 mg Sodium Salicylate per deciliter; equivalent to 25 mg Salicylic Acid per deciliter. Also contains a preservative. |
| 3. Salicylate Standard
400 mg/dl | Active Ingredients (w/v): 463.7 mg Sodium Salicylate per deciliter; equivalent to 400 mg Salicylic Acid per deciliter. Also contains a preservative. |

WARNINGS/PRECAUTIONS

The color reagent, as indicated on the label contains dilute sulfuric acid. Frequent and repetitive contact with this solution could possibly cause a dermatitis. Spills should be wiped and washed away immediately to prevent corrosion of surfaces. Do not remove chloroform preservative from salicylate standards.

REAGENT STORAGE AND STABILITY

The reagent and standard solutions of this kit are stable at room temperature at least until the expiration date shown on the label.

NOTE: Do not use reagent if it appears to be turbid.

SPECIMENS AND SPECIMEN COLLECTION

The salicylate analysis should be run on a serum sample. Avoid using plasma samples as anti-coagulants such as EDTA may interfere with the test.

Under no circumstances should blood be taken for salicylate analysis from a limb which is simultaneously receiving any infusion. Hemolysis, stasis or contamination with tissue fluid should be avoided during blood collection. When collecting blood from the toe, heel, or finger, it is most important to wipe away the first drop of blood, as this tends to be richest in tissue fluid. There is approximately a one or two-minute lag after making a skin puncture, after which the blood starts flowing freely. If blood from the warm punctured heel of an infant does not flow freely, then the leg may be massaged in order to stimulate blood flow. The heel should not be squeezed as this may cause significant contamination with tissue fluid.

The blood specimen should be centrifuged immediately after collection and the serum separated from all cells.

PROCEDURE FOR SALICYLATE

This section will describe the actual performance of the procedure using serum samples.

MATERIALS SUPPLIED

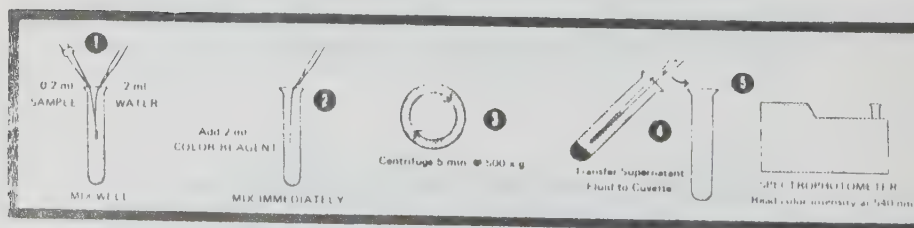
The only materials supplied with the kit are the reagent and standards described under REAGENT CONTENTS.

MATERIALS REQUIRED

1. Test tubes (13 x 100 mm is suitable) or individual cuvettes.
2. Accurate pipettes capable of delivering 2.0 ml for water, and color reagent, and 0.2 ml for sample and standards.
3. Clock or timer.
4. Centrifuge capable of attaining at least 500 g.
5. Spectrophotometer or colorimeter capable of reading absorbance at 540 nm.

PERFORMANCE OF TEST

A pictorial diagram of the procedure is shown on the facing page. The step-by-step procedure is described thereafter.



1. In an individual plastic test tube (13 x 100 mm is suitable), place 0.2 ml distilled water for the Reagent Blank. In another test tube place 0.2 ml Salicylate Standard (the 25.0 mg/dl is most commonly used). In the remaining tube(s) place 0.2 ml of serum.
2. To all tubes add 2.0 ml of water and mix contents well. (A vortex-type mixer is excellent for rapid mixing).
3. To each tube add 2.0 ml of the Salicylate Color Reagent. Mix immediately after adding the Color Reagent. (Failure to do so may result in a turbid supernatant.)
4. The sample tubes are then centrifuged 5 minutes at 500 x g. (See Note 6 and 8.)
5. Transfer supernatant fluid to cuvette.

6. The wavelength is set at 540 nm. Set the absorbance of the instrument to 0 with the Reagent Blank. Then read absorbance of the standard and samples.

CALIBRATION

This procedure follows Beer's Law in the 0 to 200 mg/dl range. If a spectrophotometer is used, it is best to use the wavelength of maximum absorbance found with the particular instrument. Individual spectrophotometers and colorimeters may vary in their characteristics, making it best that these instruments be calibrated by making various dilutions of the 400 mg/dl Salicylate Standard.

The color development of the reaction is slightly pH dependent. Therefore, tris (hydroxymethyl) aminomethane (commonly called "tris") is used to achieve the proper pH adjustment. The 25 mg/dl Salicylate Standard contains 1.375 g/dl of tris. The 400 mg/dl Salicylate Standard contains no tris and therefore a tris solution is used as one of the diluents when making up standards of various concentrations. Prepare 0.227M tris solution (27.5 gm tris/liter of solution). Then prepare calibration standards according to the ratios given in the following table:

Concentration of standard (mg/dl)	Vol. 400 mg/dl Salicylate standard (ml)	Vol. 0.227M tris (ml)	Vol. H ₂ O (ml)	Final Vol. (ml)
25	use prepared standard			
50	0.25	1	0.75	2.0
75	0.375	1	0.625	2.0
100	0.50	1	0.50	2.0
125	0.625	1	0.375	2.0
150	0.75	1	0.25	2.0
175	0.875	1	0.125	2.0
200	1.0	1	—	2.0

The various standards are handled just as serum samples when performing the test.

QUALITY CONTROL

Due to the fact that normally there are no levels of salicylate in serum, the use of assayed serum controls would serve no useful purpose. A control chart may be kept of absorbance readings of the 25 mg/dl standard.

CALCULATION OF SALICYLATE CONCENTRATION

In the range in which Beer's Law has been demonstrated to hold for the instrument used and when the 25 mg/dl Standard is used:

$$\text{Salicylate Concentration of Unknown (in mg/dl)} = \frac{A_{\text{unknown}}}{A_{\text{standard}}} \times 25.0 \text{ mg/dl}$$

Where A = absorbance

SAMPLE CALCULATION

$$A_{\text{unknown}} = 0.240$$

$$A_{\text{standard}} = 0.118$$

$$\text{Salicylate Concentration of Unknown (mg/dl)} = \frac{0.240}{0.118} \times 25.0 \text{ mg/dl} = 50.8 \frac{\text{mg Salicylate}}{\text{dl}}$$

NOTES AND PRECAUTIONS

1. Homogentisic acid, 2,5-dihydroxyphenylacetic acid, gives a color similar to salicylates in urine in this procedure. The finding of homogentisic acid in urine is diagnostic of alkaptonuria. It is possible to verify if the observed color is due to salicylate or 2,5-dihydroxyphenylacetic acid. The addition of a small amount of a base, such as sodium or potassium hydroxide, or ammonia, of a quantity sufficient to make the specimen alkaline, causes the immediate formation of a brown or black color if homogentisic acid is present. The urine of alkaptonurics also darkens on standing, from the surface downward. The disease, due to an inborn error of tyrosine metabolism, is very rare.
2. Acetoacetic acid will give a color similar to salicylates in this procedure. The presence of acetoacetic acid in urine is diagnostic of a diabetic patient in acidosis. If the color formation is reversed by heating at 100°C, acetoacetic acid is present in the urine.
3. Anticoagulants such as EDTA may interfere with this procedure. Therefore, it is recommended that serum samples and not plasma be used.
4. Sodium azide preservative in urine tubes may interfere with this test procedure.
5. Do not use reagent if it appears to be turbid.
6. This centrifuge speed is satisfactory when plastic test tubes are used. If glass test tubes are used, the precipitate may not centrifuge down. Should this occur, shake the sample tube and filter through Whatman 1 or 2 filter paper (or its equivalent). Go to step 6 of PROCEDURE.
7. In some instances, it might be desirable to do a qualitative urine analysis for salicylate. This can be done in the following manner:
 - a. Place 0.2 ml urine in a test tube.
 - b. Add 2.0 ml of Salicylate Color Reagent. If a violet color develops, salicylate is probably present. (NOTE: If a patient might be diabetic, heat the test tube. If the color fades, acetoacetic acid may be present in the urine).

IMPORTANT: The development of a violet color between the Pierce Salicylate Color Reagent and urine is in no way quantitative and will be positive in patients who have ingested therapeutic doses.

8. To convert r.p.m.'s to g, use the formula, $g = 28.38(R) \left(\frac{N}{1000} \right)^2$

Where R = radius of centrifuge head in inches

N = r.p.m.'s

EXPECTED VALUES

There are no expected values of salicylate in serum of patients who have not ingested salicylate. However, in analyzing 20 sera specimens from a general hospital, there was an average serum salicylate concentration of 2.8 mg/dl.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

ACCURACY

The accuracy of this method was determined by adding known amounts of salicylate to 32 human sera and running recovery experiments. At the 20 mg/dl level, a recovery of 101% was obtained.

For the 60 mg/dl level, a recovery of 103% was obtained.

A mean apparent salicylate concentration from 169 sera of random hospitalized patients was 2.3 mg/dl.

Recovery data indicate that salicylate concentration levels may be up to 3% higher than expected. Therefore a patient having a true salicylate concentration of 20 mg/dl could possibly show a salicylate concentration of 22.9 mg/dl (20.0 mg/dl + 0.6 mg/dl = 3% recovery error + 2.3 mg/dl = mean apparent salicylate concentration in serum); a patient with a true salicylate concentration of 60 mg/dl could possibly show a salicylate concentration of 64.1 mg/dl (60.0 mg/dl + 1.8 mg/dl + 2.3 mg/dl).

PRECISION

The precision of this method is 0.14%. This was obtained by running replicate determinations on salicylate standards at nine different levels. Then the difference of each absorbance reading from the mean was divided by the mean absorbance value and expressed as a per cent, and the average of all the per cent differences is calculated as the precision of the method.

SENSITIVITY

The sensitivity of this method for salicylate concentration was calculated according to the following equation:

$$a = \frac{A}{CL}$$

Where: a = absorptivity
A = absorbance
C = concentration (gm/L)
L = light path (cm)

Thus, the sensitivity of this method, expressed as absorptivity, is 8.25 L/gm - cm.

REFERENCES

1. N.D. Cheronis and J.B. Entrikin, *Semimicro Qualitative Organic Analysis, Second Edition*, 228 (1957). Interscience Publishers, New York, N.Y.
2. Norbert W. Tietz, *Fundamentals of Clinical Chemistry*, 882-884, (1970).
3. H.F. Weisberg, in I. Davidson and B.B. Wells, Editors, *Todd-Sanford Clinical Diagnosis by Laboratory Methods, Thirteenth Edition*, 499-500, (1972).
4. A.K. Done, Salicylate Intoxication, Significance of measurements of salicylate in blood in cases of acute ingestion. *Pediatrics*, **26**, 800-807 (1970).
5. D. Sohn and J. Simon, Rapid identification of psychopharmacologic agents in cases of drug abuse. *Clin. Chem.*, **18**, 405-409 (1972).

GENERAL REFERENCES

1. R.P. MacDonald, *Standard Methods of Clinical Chemistry*, **5**, 405-409 (1965). Academic Press, New York

An dieser Stelle möchte ich besonders herzlich Frau Professor Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt danken, die mir, ebenso wie schon für meine erste Dissertation im Fach Zahnmedizin, freundlicherweise auch dieses Thema überlassen hat. Ihre große Hilfsbereitschaft sowie ihre guten Ratschläge trugen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Herrn Prof. Dr. H.-B. Wuermeling, Vorstand des Institutes für Rechtsmedizin danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Mein weiterer Dank gilt Frl. R. Scheffler, die in hervorragender Weise die Abbildungen dieser Arbeit angefertigt hat.

Für ihre Geduld bei der Reinschrift des Manuskriptes spreche ich meiner Frau Judith besondere Anerkennung und meinen herzlichen Dank aus.

LEBENS LAUF

PERSONALIEN: Walter Mauser
geb. 12.12.1956 in Erlangen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Dr. Karl Mauser, Beamter
Annemarie Mauser, geb. Schürr

AUSBILDUNG : 1963 - 1967 Volksschule in Herzogenaurach
1967 - 1971 Kaiser-Heinrich-Gymnasium in Bamberg
1971 - 1976 Marie-Therese-Gymnasium in Erlangen
1976 Abitur
1976 - 1977 Studium der Zahnmedizin an der Philipps
Universität in Marburg/Lahn
1977 - 1982 Studium der Zahnmedizin an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen
5.4.1979 Zahnärztliche Vorprüfung
25.6.1982 Zahnärztliche Prüfung
12.7.1982 Promotion zum Dr. med. dent
1977 - 1983 Studium der Medizin an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen
28.8.1979 Ärztliche Vorprüfung
9.12.1983 Ärztliche Prüfung

Druck: Copy Center 2000
Obere Karlstraße 30
8520 Erlangen